

**Un modèle d'étude *in vitro* de la réversion tumorale du cancer du col utérin dû aux
infections par le virus de papillome humain à haut risque
(VPH 16 et 18)**

Par

Clara Ernestine NOMENJANAHARY

Thèse présentée pour
répondre à l'une des exigences
de la Maîtrise ès Sciences (M.Sc) en biologie

École des études supérieures
Université Laurentienne
Sudbury Ontario

© Clara Ernestine NOMENJANAHARY, 2013

THESIS DEFENCE COMMITTEE/COMITÉ DE SOUTENANCE DE THÈSE

Laurentian Université/Université Laurentienne
School of Graduate Studies/École des études supérieures

Title of Thesis Titre de la thèse	UN MODÈLE D'ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DE LA RÉVERSION TUMORALE DU CANCER DU COL UTÉRIN DÛ AUX INFECTIONS PAR LE VIRUS DE PAPILLOME HUMAIN À HAUT RISQUE (VPH 16 ET 18)	
Name of Candidate Nom du candidat	Nomenjanahary, Clara	
Degree Diplôme	Maîtrise ès sciences	
Department/Program Département/Programme	Biologie	Date of Defence Date de la soutenance 21 juin 2013

APPROVED/APPROUVÉ

Thesis Examiners/Examineurs de thèse:

Monsieur Eric Gauthier
(Co-supervisor/Co-directeur de thèse)

Madame Céline Boudreau-Larivière
(Co-supervisor/Co-directrice de thèse)

Madame Sabine Montaut
(Internal Examiner/Examinatrice interne)

Approved for the School of Graduate Studies
Approuvé pour l'École des études supérieures
Dr. David Lesbarrères
M. David Lesbarrères
Director, School of Graduate Studies
Directeur, École des études supérieures

CLAUSE D'ACCESSIBILITÉ ET PERMISSION D'UTILISER DES DOCUMENTS

Je, **Clara Nomenjanahary**, accorde à l'Université Laurentienne et à ses agents l'autorisation non exclusive d'archiver ma thèse ou mon rapport de projet et d'en permettre l'accès, en tout ou en partie et dans toute forme de média, maintenant ou pour la durée de mon droit de propriété du droit d'auteur. Je conserve tous les autres droits de propriété du droit d'auteur de la thèse ou du rapport de projet. Je me réserve également le droit d'utiliser dans de futurs travaux (comme des articles ou des livres) l'ensemble ou des parties de ma thèse ou de mon rapport de projet. J'accepte en outre que la permission de reproduire cette thèse de quelque manière que ce soit, en tout ou en partie à des fins savantes, soit accordée par le ou les membres du corps professoral qui ont supervisé mes travaux de thèse ou, en leur absence, par le directeur ou la directrice de l'unité dans lequel mes travaux de thèse ont été effectués. Il est entendu que toute reproduction ou publication ou utilisation de cette thèse ou de parties de celles-ci à des fins lucratives ne doit pas être autorisée sans ma permission écrite. Il est également entendu que cette copie est présentée sous cette forme par l'autorité du titulaire du droit d'auteur uniquement pour fins d'études et de recherches particulières et ne doit pas être copiée ou reproduite sauf en conformité avec la législation sur le droit d'auteur sans l'autorisation écrite du titulaire du droit d'auteur.

RÉSUMÉ

La réversion tumorale est un processus de transformation cellulaire peu fréquent qui s'explique par le rétablissement du contrôle de la croissance cellulaire aboutissant au phénotype cellulaire normal. Plusieurs agents sélectifs (virus, produits chimiques, interféron) peuvent être utilisés pour provoquer ce phénomène. L'efficacité de ces thérapies dépend de l'agressivité des cellules à traiter et les gènes qui sont bloqués. Les cellules HeLa et SiHa sont des lignées cellulaires utilisées fréquemment comme modèle *in vitro* pour étudier le cancer du col utérin. Ces deux lignées cellulaires comportent des oncogènes E6 et E7 du virus du papillome humain (VPH) à haut risque de type 18 pour les cellules HeLa et de type 16 pour les cellules SiHa. Les oncoprotéines virales E6 et E7 bloquent les protéines suppresseurs de tumeur p53 et pRb respectivement ce qui entraîne la transformation en cellules cancéreuses. La réactivation de la protéine p53 et/ou de la protéine pRb ou d'autres types de protéines effectuée par des agents sélectifs oncosuppresseurs peut renormaliser le cycle cellulaire. L'étude proposée pour cette thèse vise à étoffer la littérature scientifique afin d'expliquer la faisabilité d'établir un modèle *in vitro* qui serait exploité pour 1) déterminer si la réversion tumorale a lieu de manière spontanée dans les cellules HeLa et SiHa, 2) comprendre les effets de différentes thérapies pouvant entraîner la réversion tumorale des cellules cancéreuses du col utérin et 3) comprendre le mécanisme d'action des thérapies oncosuppresseurs dans le contexte de la réversion tumorale du cancer du col utérin.

REMERCIEMENTS

Je remercie premièrement mes superviseurs Drs. Éric Gauthier et Céline Boudreau-Larivière pour leur compréhension et pour avoir assumé la responsabilité d'encadrer ma thèse, pour leur soutien moral, leur patience et leur appui dans les moments difficiles. Ils m'ont permis de travailler sereinement et de surmonter beaucoup de défis.

Je remercie deuxièmement l'Université Laurentienne et l'Université de Fianarantsoa d'avoir effectué un projet ensemble et de m'avoir choisi en tant qu'étudiante pour aider à réaliser ce projet.

Je remercie tout particulièrement l'Université Laurentienne pour ses différents services offerts (les besoins spéciaux, le service de santé....), de m'avoir écouté et d'avoir été compréhensive durant les moments difficiles. J'aimerais exprimer exceptionnellement mes sincères remerciements à Madame Sally Lavergne pour son soutien, son encouragement, sa grande générosité. Vous êtes tellement gentille que j'ai l'impression de recevoir une grande amie.

Je remercie aussi mes collègues (Paul, Anne-Marie, André Michelle, Ramya, Kierann, Christopher....) pour leur aide et leur encouragement.

Je tiens spécifiquement à remercier Dr. David Lesbarrères qui a fortement participé à la réussite de mes travaux par son soutien durant les difficultés et m'offrant des matériaux. Vous êtes très sympathique et il paraît sincèrement que vous connaissez les besoins des étudiants.

Je remercie tous mes amis (Nary, Junette, Haja, Ali...) et mes familles qui ont fait des sacrifices durant mes années ici au Canada et qui me soutiennent avec des mots de confort.

Je désire également remercier la famille Begona (Aura, Maria, Paula) pour votre accueil chaleureux en offrant un hébergement. J'ai été très heureuse de vous rencontrer et surtout pour votre gentillesse de me supporter.

Je voudrais aussi remercier mes familles spirituelles, l'Église Catholique et Adventiste et spécialement Père Perron Ronald, pour leur encouragement et leur soutien moral. Merci pour votre accueil et les mots de réconforts.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	vi
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
1.0. INTRODUCTION.....	1
1.1 . GÉNÉRALITÉS SUR LE CANCER DU COL UTÉRIN	1
1.1.1 . Définition:.....	1
1.1.2 . Processus d'altération.....	1
1.2 . PROPRIÉTÉS FONDAMENTALES DES CELLULES CANCÉREUSES.....	2
1.2.1 . Caractéristiques des cellules cancéreuses.....	2
1.2.2 . Gènes impliqués à la cancérisation	3
1.3 . FACTEURS DE RISQUE QUI PEUVENT INDUIRE LE CANCER.....	3
1.3.1 . Mutations spontanées	3
1.3.2 . Agression génotoxiques	4
1.3.3 . Agrégations virales.....	4
1.3.4 . Exemple du cancer d'origine virale: le cancer du col de l'utérus	4
1.4 . MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE	5
1.4.1 . Oncogènes.....	2
1.4.2 . Gènes suppresseurs de tumeurs :	7
2.0. TUMEUR DU COL DE L'UTERUS	8

2.1 . ANATOMIE DU COL UTÉRIN	8
2.1.1 . Appareil génital féminin.....	8
2.1.2 . Épithélium de l'exocol	9
2.1.3 . Épithélium de l'endocol	9
2.2 . ÉTUDE DE L'AGENT INFECTIEUX QUI CAUSE LE CANCER UTÉRIN : LE VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN	10
2.2.1 . Classification	10
2.2.2 . Composantes génétiques du VPH et leur fonction.....	113
2.2.3 . Cycle de réplication viral	13
2.2.4 . Contrôle de la transcription et de la réplication	145
2.2.5 . Les oncogènes du VPH.....	15
2.2.6 . Mécanisme de l'évolution du cancer du col utérin	18
2.2.7 . Traitement et prévention de VPH.....	21
3.0. MODELES DE REVERSION TUMORALE POUR UN NOUVEAU TRAITEMENT DU CANCER DU COL UTERIN.....	23
3.1. ÉTUDE DE LA RÉVERSION TUMORALE DU CANCER	23
3.1.1 . Définition du terme réversion	23
3.1.2 . Caractéristique de la cellule révertante	23
3.2. OBTENTION DES CELLULES RÉVERTANTES À PARTIR DE L'UTILISATION DE DIFFÉRENTS AGENTS SÉLECTIFS .	24
3.2.1 . Virothérapie	24
3.2.2 . Chimiothérapie.....	37
3.2.3 . Immunothérapie.....	45
3.3 CELLULES RÉVERTANTES DÉRIVÉES DES CELLULES HeLa ET SiHa	48
3.3.1 . Chimiothérapie appliquée à la réversion tumorale des cellules HeLa et SiHa	49

3.3.2 . <i>Relation entre la virothérapie et les cellules révertantes dérivées des cellules HeLa et SiHa</i>	53
3.3.3 . <i>Génothérapie impliquée dans la réversion tumorale du cancer du col utérin</i>	55
DISCUSSION	57
CONCLUSION	65
REFERENCES	70

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1. Structure de l'appareil génital féminin	8
Figure 2-2. La coupe histologique de l'exocol	9
Figure 2-3. La coupe de l'endocol : Ce tissu est formé par un épithélium cylindrique composé des stroma	10
Figure 2-4. Particule virale.....	11
Figure 2-5. Organisation du génome viral du VPH16	13 3
Figure 2-6. Cycle de réplication virale	14 4
Figure 2-7. Inactivation de la protéine suppresseur de tumeur Rb par l'oncogène E7	17 7
Figure 2-8. Inhibition de la protéine suppresseur p53 par l'oncogène E6.....	18 8
Figure 2-9.Évolution du cancer	21 1
Figure 3-1. Mécanisme réactionnel entre l'hydroxylamine et l'acétylthioester effectué par le promédicament CB1954 dans la cellule cancéreuse	31 1
Figure 3-2 : Structure du méthanesulfonate d'éthyle	39 9
Figure 3-3. Structure de la désoxyuridine	40
Figure 3-4. Structure de la nitrosoguanidine de méthyle	40
Figure 3-5. Structure de <i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i> (SAHA)	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Sélection des cellules révertantes par l'utilisation des virus oncolytiques	25
Tableau 2. Produits chimiothérapeutiques causant la réversion de cellules tumorales	39
Tableau 3: Réversion tumorale due à l'utilisation de composants du système immunitaire .	45
Tableau 4. Sélection des cellules révertantes dérivées des cellules HeLa et SiHa lors de leur exposition aux différents agents sélectifs.....	49

1.0. Introduction

1.1. Généralités sur le cancer du col utérin

1.1.1. Définition

Le cancer se développe par la dérégulation des mécanismes qui contrôlent la croissance et la prolifération de la cellule (1, 2). Durant le cycle de réplication cellulaire, plusieurs protéines régulatrices sont responsables du maintien d'un équilibre entre, d'un côté, la prolifération et la survie cellulaire, et de l'autre l'arrêt de la prolifération, ou, lorsqu'approprié, la mort cellulaire par apoptose. Cependant, dans certaines situations, certaines protéines régulatrices peuvent être inactivées. Le cycle de vie cellulaire est alors bouleversé ce qui peut mener à la formation de tumeurs. Des altérations des proto-oncogènes (gènes dont l'expression favorise la formation des cancers) et/ou des gènes suppresseurs de tumeur (gènes dont l'expression permet de contrôler la croissance cellulaire) peuvent entraîner la transformation de cellule normale en cellule cancéreuse. Pour le cas de proto-oncogène, des translocations chromosomiques comme t(11,14) peuvent se produire dans certains lymphomes lors d'une infection virale. La dérégulation de ces chromosomes contribue à la formation des cellules cancéreuses (2). Par comparaison, la mutation ou l'inactivation des gènes régulateurs lors de l'exposition cellulaire aux facteurs cancérigènes conduit à la formation des cellules malignes (2).

1.1.2. Processus d'altération

À cause de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation de la télomérase, les cellules malignes se multiplient de façon incontrôlée (3-6). Les cellules de la muqueuse utérine peuvent sécréter des protéines qui inactivent les gènes

suppresseurs de tumeurs p53 et pRb, contribuant ainsi à la formation de tumeurs malignes qui se répandent dans tous les tissus sains voisins. Généralement, le cancer est défini comme une maladie génétique non héréditaire (7) parce que dans la maladie héréditaire, l'anomalie génétique se trouve dans le chromosome d'un parent qui est transféré au zygote, tandis que le cancer est dû à la mutation spontanée du gène.

Le cheminement tumoral correspond à l'instabilité génétique des cellules cancéreuses. Des modifications génétiques spontanées vont se réaliser menant à l'existence de clones variants et des tumeurs hétérogènes (7, 8). Ces clones variants qui ont des caractères invasifs, antigéniques et métastatiques hétérogènes ou encore une sensibilité inégale à la chimiothérapie, sont agressifs.

1.2. Propriétés fondamentales des cellules cancéreuses

1.2.1. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Les mutations génétiques peuvent bouleverser le développement de la cellule normale, stimulant la formation du cancer. Ces cellules transformées sont appelées cellules tumorales car elles se développent indépendamment de signaux inducteurs externes (9) c'est-à-dire qu'elles ne reçoivent plus le signal de la différenciation cellulaire (10) et le signal d'induction apoptotique (11). En temps normal, ces signaux inducteurs contrôlent la division cellulaire ainsi que la survie de la cellule. Les cellules transformées perdent aussi leur capacité de communication avec les cellules voisines ou avec la matrice extracellulaire (9). Elles croissent individuellement et rapidement sans arrêt et poussent continuellement l'une au-dessus de l'autre en formant une masse appelée foyer (12, 13). Alors ces cellules ont comme caractéristique de proliférer l'une au-dessus de l'autre quand on les cultive dans le flacon de culture cellulaire (9), tandis que les

cellules normales arrêtent de se multiplier lorsqu'elles recouvrent toute la surface du flacon (un phénomène appelé « inhibition de contact »).

1.2.2. Gènes impliqués à la cancérisation

Les gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 et p21 jouent des rôles primordiaux durant le cycle de vie cellulaire (14). Ils assurent le processus de la transcription de la cellule et la progression du cycle cellulaire dans la phase G1. Les mutations inactivant les gènes p53 et p21 résultent en une diminution de la capacité cellulaire à réparer l'ADN, favorisant l'accumulation de dommages au génome. La capacité cellulaire d'entrer en apoptose suite à des dommages à l'ADN est grandement réduite parce que p53 et p21 sont des agents activateurs de la mort cellulaire programmée. La réplication cellulaire devient incontrôlée en raison de la suppression de l'apoptose. Les cellules cancéreuses se caractérisent donc également par un dérèglement des mécanismes de l'apoptose.

1.3. Facteurs de risque qui peuvent induire le cancer

Plusieurs facteurs peuvent entraîner des altérations de la structure ou de l'expression des gènes qui conduit à la formation du cancer

1.3.1. Mutations spontanées

Les mutations spontanées causent une altération de la séquence d'ADN durant la réplication sans réparation (15). Autrement dit, la mutation se produit au hasard et peut entraîner un changement dans l'expression ou la fonction des protéines cellulaires. Le dysfonctionnement de ces protéines peut conduire au processus de cancérogenèse.

1.3.2. Agressions génotoxiques

Les agressions génotoxiques (substances qui peuvent briser le chromosome) sont effectuées par des agents chimiques carcinogènes exogènes ou endogènes et des phénomènes physiques comme des radiations ionisantes et non ionisantes ou les rayons UV (15). Ces agents modifient ou altèrent une ou plusieurs bases dans la séquence d'ADN.

1.3.3. Agrégations virales

Ce sont les anomalies au niveau de la séquence d'ADN à cause de l'insertion des oncogènes viraux dans le génome de la cellule l'hôte qui conduisent graduellement aux lésions géniques par l'apparition de l'instabilité génétique et des cellules aneuploïdes qui conduisent aux changements phénotypiques des cellules (16).

1.3.4. Exemple du cancer d'origine virale: le cancer du col de l'utérus

Le cancer invasif du col de l'utérus est causé par l'infection des cellules du col par certains types du virus du papillome humain (VPH). Parmi ces types, les VPH 16 et 18 sont les plus récriminés pour le cancer du col utérin (53.5% des cas attribuables au VPH16 et 17.2% au VPH18) (17-19). Ces types de virus contiennent les oncoprotéines E6 et E7 qui ont comme propriété de se lier aux protéines suppresseurs de tumeur p53 et pRb. Ces dernières jouent un rôle primordial dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. En plus, l'inactivation de ces deux oncoprotéines se relie à l'activation de la télomérase via l'augmentation de l'expression de hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) qui est effectuée par l'oncoprotéine E6 (5). Le fait que ces oncoprotéines se fixent sur ces protéines et activent l'enzyme télomérase entraîne la perturbation du cycle de vie cellulaire. Ces bouleversements de la vie cellulaire induisent certaines mutations dans l'ADN cellulaire d'où vient la formation des carcinomes.

1.4. Mécanismes moléculaires de la transformation cellulaire

La cellule cancéreuse a des caractéristiques totalement différentes de celles de la cellule normale telles que : la croissance incontrôlée, l'inhibition de l'apoptose, l'immortalité, la capacité d'invasion, la production de métastases et la stimulation d'une néoangiogénèse tumorale (20). Ces propriétés de la cellule cancéreuse sont obtenues à partir de la perturbation de l'activité des produits de nombreux gènes (20).

1.4.1. Oncogènes

a. Propriété :

Les oncogènes (comme le E6 et E7 du VPH) sont l'ensemble de tous les gènes cellulaires qui peuvent conduire à la transformation de la cellule. Le proto-oncogène (e.g. K-ras, RET) est un gène normal qui se trouve dans le génome cellulaire. Par contre, une mutation sur une seule de deux copies du proto-oncogène peut être suffisante pour le convertir en oncogène. Ce dernier participera alors aux dérèglements cellulaires qui pourraient éventuellement mener à la formation d'un cancer invasif (21, 22).

b. Mécanismes d'activation des oncogènes :

i. Mutations ponctuelles :

Les mutations ponctuelles sont l'enlèvement (i.e. délétion) ou l'insertion ou la substitution d'un nucléotide dans un gène. Elles peuvent entraîner des effets catastrophiques qui peuvent induire de grands changements dans le code génétique (23). Ceci peut avoir un impact important sur les protéines encodées par ces gènes mutés : inactivation, suractivation, altération de la stabilité, changement de la localisation

intracellulaire, etc. La présence de ces protéines anormales peut ainsi contribuer à la formation du cancer.

ii. Amplification génique :

Une réplication anormale d'ADN qui contient un proto-oncogène peut se réaliser au cours d'un cycle cellulaire, donnant lieu à l'accumulation de plusieurs copies géniques de l'oncogène. La surabondance de ces oncogènes libres mène à la surproduction des protéines correspondantes. Prenons l'exemple de cancer du poumon, où la surexpression du récepteur EGFR est reconnue comme étant responsable de la formation de la tumeur (24).

iii. Translocation chromosomique :

Au cours de la division cellulaire, il est possible que deux chromosomes non homologues s'échangent réciproquement des portions de leur ADN, un phénomène qu'on appelle translocation. Ceci peut provoquer des déséquilibres chromosomiques qui pourront contribuer au développement d'un cancer (25, 26). Prenons l'exemple du lymphome de Burkitt, où une translocation entre les chromosomes 8 et 14 (t(8,14)) est observée dans les lymphocytes B (26). Le résultat de cette translocation est que l'expression du gène c-myc est maintenant sous le contrôle du puissant promoteur des immunoglobulines. Ceci cause une augmentation considérable de l'abondance de la protéine c-myc, entraînant du coup la dérégulation du cycle cellulaire et la transformation du lymphocyte B en lymphome.

iv. Insertion du génome viral :

Pour la majorité des virus oncogènes, l'incorporation d'une partie ou de la totalité du génome viral dans l'ADN cellulaire est suffisante pour activer le processus du cancer dans la cellule (27, 28). Prenons l'exemple de HPV à haut risque, l'incorporation du génome viral

(contenant les oncogènes E6 et E7) dans le génome de la cellule humaine est suffisante pour causer la formation du cancer du col utérin.

1.4.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs :

La mutation d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs mène à la néoformation de la cellule normale en cellule maligne. Il y a plusieurs types de gènes suppresseurs de tumeurs chez l'homme, mais les plus connus sont : p53 et WT1 qui modifient la transcription; et p16 et pRb (protéine du rétinoblastome) qui participent à la régulation du cycle cellulaire (29, 30). La formation de la tumeur due à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs peut être héréditaire et/ou spontanée. La maladie qui est développée par l'acquisition d'une version mutée du pRb ou p53 conduit généralement à un cancer non héréditaire. Le pRb et le p53 jouent un rôle très important dans le cycle cellulaire, c'est-à-dire qu'ils interrompent le cycle cellulaire en réponse à plusieurs stress génotoxiques, dont les dommages à l'ADN ou des anomalies au niveau des chromosomes. Les protéines pRb et p53 activent aussi la voie apoptotique (30, 31). Pour le cas des cellules cancéreuses qui contiennent des protéines pRb ou p53 mutées, ces cellules perdent leur capacité d'arrêter le cycle cellulaire et d'induire l'apoptose suite à des dommages à l'ADN. Alors, l'inactivation de p53 et ou pRb peut conduire à l'apparition d'un cancer agressif qui pourra évoluer jusqu'à la production de métastases.

2.0. Tumeur du col de l'utérus

2.1. Anatomie du col utérin

2.1.1. Appareil génital féminin

La Figure 2.1 représente la coupe longitudinale de l'appareil génital féminin. La partie plus externe est le vagin. Le col de l'utérus le suit. Ce dernier se divise en deux parties selon son type de tissus. La partie externe appelée exocol, est constituée de l'épithélium malpighien ou pavimenteux stratifié non kératinisé (Figure 2.2) où le cycle répliatif du virus HPV commence (32). La partie interne, nommée endocol, est définie par la présence de l'épithélial cylindrique (Figure 2.3) (33, 34).

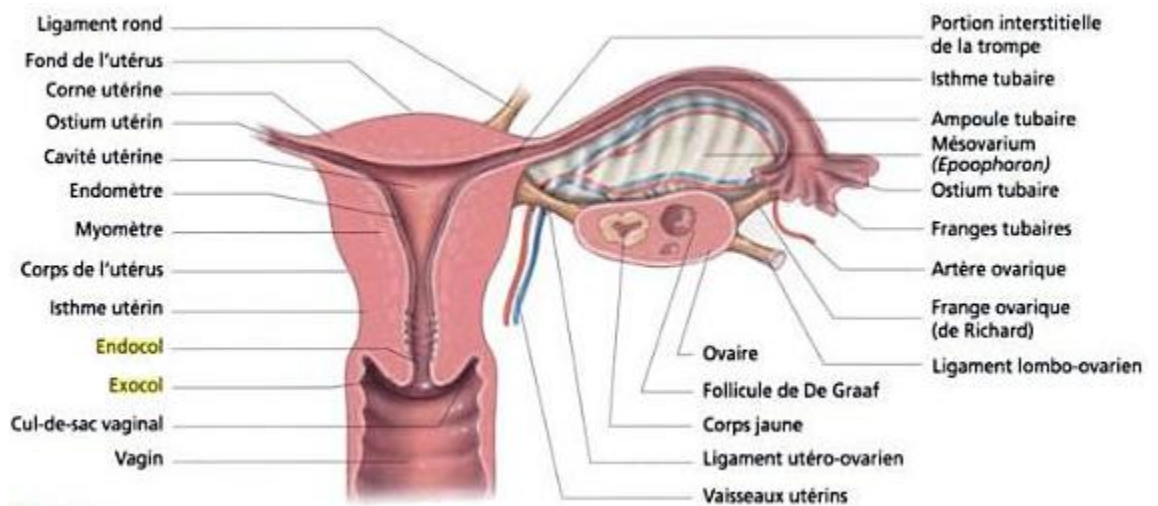


Figure 2-1. Structure de l'appareil génital féminin

Les deux éléments intéressants dans l'étude du cancer du col utérin sont l'endocol et l'exocol (en jaune) où l'infection virale commence (35).

2.1.2. Épithélium de l'exocol

La cellule de l'exocol (Figure 2.2) est un épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé en couleur rose pâle et riche en glycogène (36)

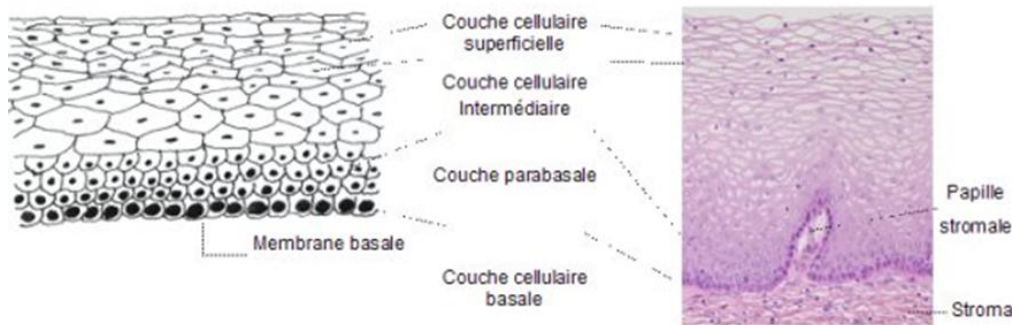


Figure 2-2. La coupe histologique de l'exocol

Ce tissu est constitué par l'épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé. Il est divisé en 3 couches : membrane basale où l'infection virale commence, couche cellulaire intermédiaire et couche cellulaire superficielle (36).

2.1.3. Épithélium de l'endocol

L'endocol (Figure 2.3) est formé par une seule couche de cellules cylindriques avec des noyaux sombres (36).

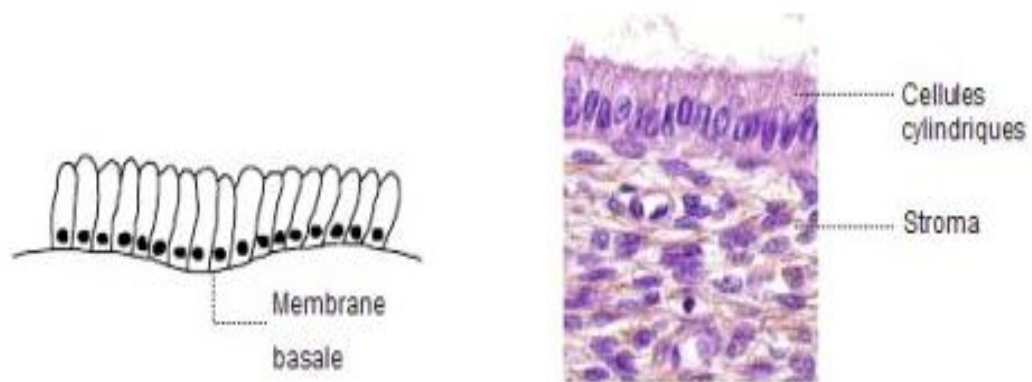


Figure 2-3. La coupe de l'endocol : Ce tissu est formé par un épithélium cylindrique composé des stroma (36) .

2.2. Étude de l'agent infectieux qui cause le cancer utérin : le virus du papillome humain

2.2.1. Classification

Les papillomavirus humains (VPH) appartiennent à la famille de Papillomaviridae (19, 37). Ces virus sont classés selon leur séquence nucléotidique génomique. Plus de 100 types de VPH sont identifiés. Ce sont des virus nus, ayant une capside icosaédrique à symétrie cubique de 55 nm de diamètre avec 72 capsomères (Figure 2-4). Leur génome est une molécule d'ADN bicaténaire circulaire, superenroulée composée de 8000 paires de bases. Une région précoce E(*Early*) du génome viral encode les protéines régulatrices. Une région tardive L (*late*) est responsable de la synthèse des protéines capsidiques (38).

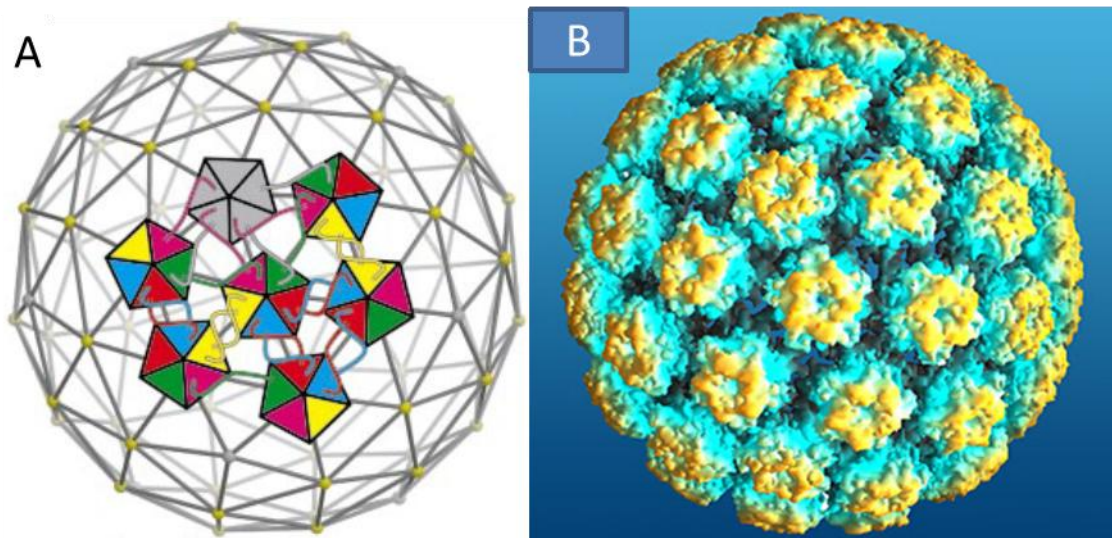


Figure 2-4. Particule virale

La particule virale est composée de plusieurs capsomères sous forme de pentamères (39)

2.2.2. Composantes génétiques du VPH et leur fonction.

Le génome du VPH encode plusieurs cadres de lecture ouverts (Figure 2.5), qui ont les fonctions suivantes.

a. Protéines précoces E (Early)

- E1 : ce gène encode la protéine E1 composée de 600 à 650 acides aminés (32). Ce gène joue un rôle très important dans la réplication et la transcription (40)
- E2 : la protéine dérivée de ce gène est constituée de 400 acides aminés (32) et possède une fonction semblable à E1 (40, 41)

La perte de ces deux gènes (E1 et E2) entraîne une dérégulation de la formation des oncoprotéines E6 et E7 (40)

- E4 : la protéine codée par E4 participe à la maturation de la particule virale et aide à la libération des virions (42)

- E5 : le cadre de lecture E5 est court et encode de petites protéines (7 kb) constituées de 50 acides aminés (32). Cette protéine participe à l'évasion cellulaire (43, 44). Autrement dit, elle participe à la progression de la lésion pré-maligne
- E6 : ce gène code l'oncoprotéine E6 constituée de 150 acides aminés. Cette oncoprotéine est nécessaire à la modification génétique de la cellule. Elle active la télomérase et inhibe la protéine suppresseur de tumeur p53 (5, 19)
- E7 : celle-ci ressemble à E6 à cause de son importance dans la transformation cellulaire. L'oncoprotéine E7 active la télomérase et inhibe la protéine suppresseur de tumeur pRb (5, 19)
- E8 : la protéine E8 a une fonction semblable à la protéine du gène E5 (45).

b. Protéines tardives L (Late)

- L1 : un gène tardif qui synthétise la majorité des protéines de la capsid virale. Il contient des antigènes identiques pour tous les papillomavirus et ainsi que quelques antigènes spécifiques aussi (46, 47).
- L2 : il s'agit d'un gène tardif qui produit les protéines capsidiques mineures et comporte généralement certains déterminants antigéniques (46, 47, 48).

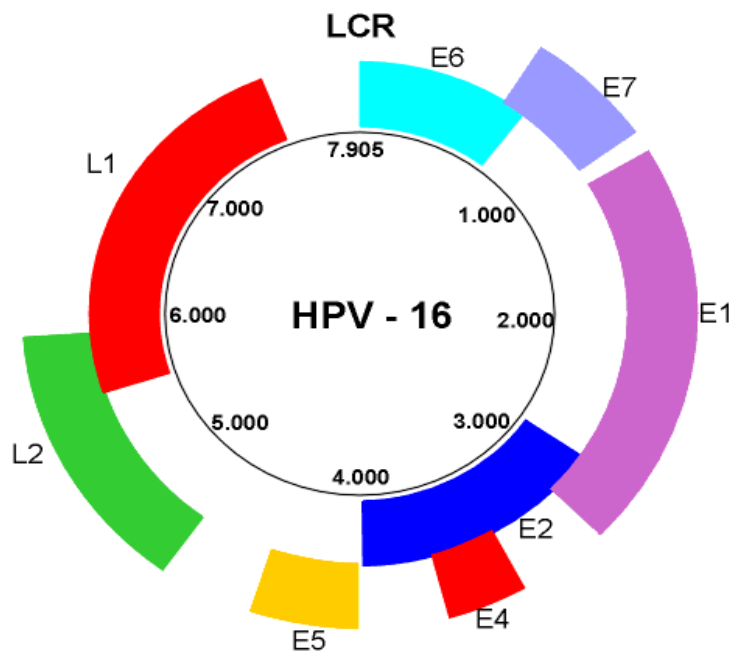


Figure 2-5. Organisation du génome viral du VPH16

Le génome viral est constitué de 9 cadres de lectures ouvertes divisés en deux groupes majeurs : les gènes précoces E (E1, E2, E4, E5, E6, E7 et E8) qui synthétisent les protéines précoces - ce sont des enzymes nécessaires au cycle de réplication- et les gènes tardifs L (L1 ET L2) qui codent les protéines de structure (49, 50).

2.2.3. Cycle de réplication viral

Le cycle de réplication dépend de la différenciation de l'épithélium (Figure 2-6). Les VPH peuvent s'attacher sur la membrane basale ou les cellules épithéliales basales via les récepteurs sulfates protéoglycane héparines et une intégrine (51, 52,53, 54) Ensuite, les cellules englobent les virus par le phénomène d'endocytose via les clathrines pour le cas du VPH 16 et des alvéoles pour le VPH 31 (54). Quand le virus arrive dans la cellule, il libère son génome par le phénomène de décapsidation. Ce génome migre vers le noyau grâce au réseau protéique du cytosquelette. Durant la première phase de l'infection, seules les protéines virales E1 et E2 sont exprimées, puis l'expression d'E6 et E7 suit. L'ADN viral se combine avec l'ADN de la cellule, un phénomène qui se fait de façon réversible (54). On

trouve rarement une mutation d'insertion, mais cette intégration déclenche le processus d'immortalisation de la cellule.

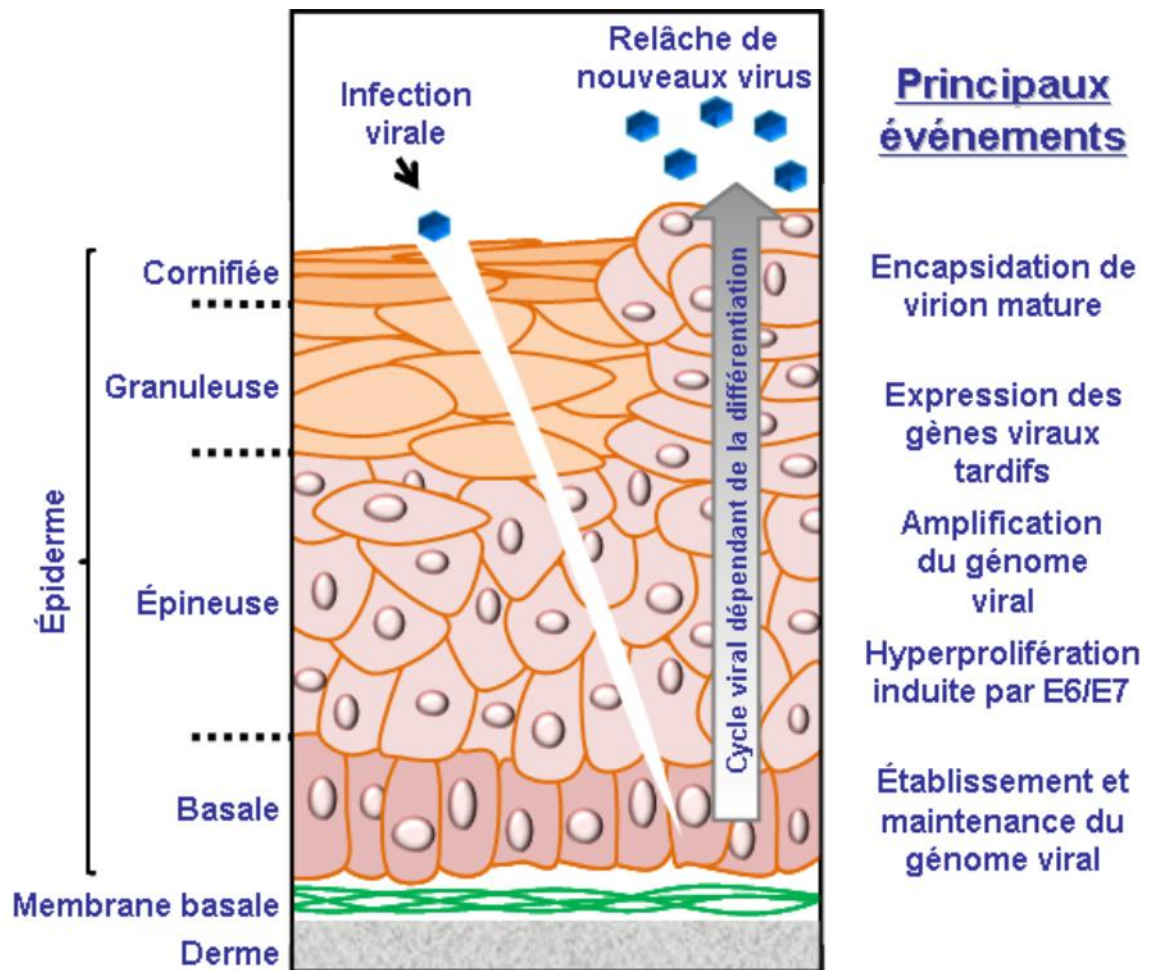


Figure 2-6. Cycle de réplication virale

Cette image représente le déroulement du cycle de réplication du papillomavirus qui commence par son infection dans la membrane basale de l'épithélium pavimenteux. La partie à gauche représente les différentes couches normales de l'épithélium. La partie à droite montre l'altération de cet épithélium à cause de l'infection virale (52).

2.2.4. Contrôle de la transcription et de la réplication

La région non-codante de tous les génomes du papillomavirus se situe entre la fin du cadre de lecture L1 et le début du cadre de lecture E6. Cette région contient environ 850 paires de bases (55). Elle est complexe et peut contrôler l'expression du génome viral et sa multiplication en présence de signaux de régulation. Cette région contient des signaux de

polyadénylation qui permettent de transcrire les cadres de lectures tardifs et l'initiation de nombreux messagers précoces par le biais d'une boîte TATA. De plus, cette région comporte plusieurs éléments communs pour tous les papillomavirus et des éléments particuliers qui jouent aussi un rôle important dans le processus de cancérisation.

2.2.5. Les oncogènes du VPH

Le mode de réplication viral commence durant l'état de différenciation de la cellule hôte. Les oncogènes de VPH, comme le VPH 16 dans la Figure 2-5, contiennent 8 cadres de lectures ouverts (ORF : *Open Reading Frames*) et transcrivent l'ARNm sous le contrôle de LCR (*Long Control Region*). La réplication de ce virus dépend des enzymes et de la machinerie de la cellule hôte (6, 19, 56). Leur réplication a lieu durant la division des kératinocytes. Lors de l'incorporation des oncogènes viraux dans le génome de la cellule hôte durant la phase S, les oncoprotéines obtenues ont pour fonction d'endommager la membrane basale du col utérin (56).

a. La description et le rôle de l'oncogène E7

La protéine E7 du VPH à haut risque est une petite phosphoprotéine qui n'a pas d'homologue chez l'humain (19, 56). Cette oncoprotéine comprend deux domaines importants CR1 (*conserved region 1*) et CR2 (*conserved region 2*) dont la structure a une ressemblance à la protéine E1A de l'adénovirus et au grand antigène du virus SV40. Ces oncoprotéines modifient les protéines nécessaires à la régulation de la transcription de la protéine E2F, comme les protéines pRb, P₁₀₇ et P₁₃₀ durant la phase S de la division cellulaire (Figure 2-7) (56). Ces oncogènes E7 mènent à la dégradation de la protéine de pRb via l'ubiquitine ligase cullin2-E₃. L'E7 de VPH est lié avec le pRb par les acides aminés Leu-X-Cys-X-Glu qui se localisent dans le domaine CR2 (6). Certains acides aminés qui se situent dans le domaine CR1 sont également importants dans la destruction de pRb. L'E7 du VPH à haut

risque, par comparaison à celui du VPH à bas risque, cause l'inhibition de la protéine pRb. Par la suite, la protéine cellulaire E2F est activée ce qui stimule la prolifération du cycle cellulaire (Figure 2-7). Par conséquent, la présence de l'oncogène E7 du VPH à haut risque détériore le cycle cellulaire en bloquant la fonction de la protéine suppresseur de tumeur pRb.

b. L'oncogène E6 de VPH

L'oncogène E6 de VPH est composé de 150 acides aminés. Cet oncogène E6 de VPH à haut risque peut modifier la structure de la protéine p53 par la protéolyse (19, 57). Premièrement, l'E6 du VPH à haut risque se lie avec la protéine cellulaire E6-Ap, puis le complexe E6-E6Ap s'associe avec le p53 menant à la dégradation de ce dernier via le protéasome (Figure 2.8). Ceci fait en sorte que la protéine p53 se trouve en faible quantité durant la phase G1 du cycle cellulaire chez les cellules infectées. La conséquence immédiate de cette réduction des niveaux de p53 est que la progression du cycle cellulaire, notamment pendant la phase G1, se fait de manière ininterrompue et ne répond plus aux signaux de stress déclenchés par les dommages à l'ADN. De plus, l'induction de l'apoptose, qui accompagne généralement l'infection virale et qui limite la propagation du virus, est compromise. Alors, la principale fonction d'E6 est de perturber un élément central du contrôle de la division cellulaire. Corollairement, la prolifération de cette cellule devient incontrôlable, facilitant son immortalisation.



17

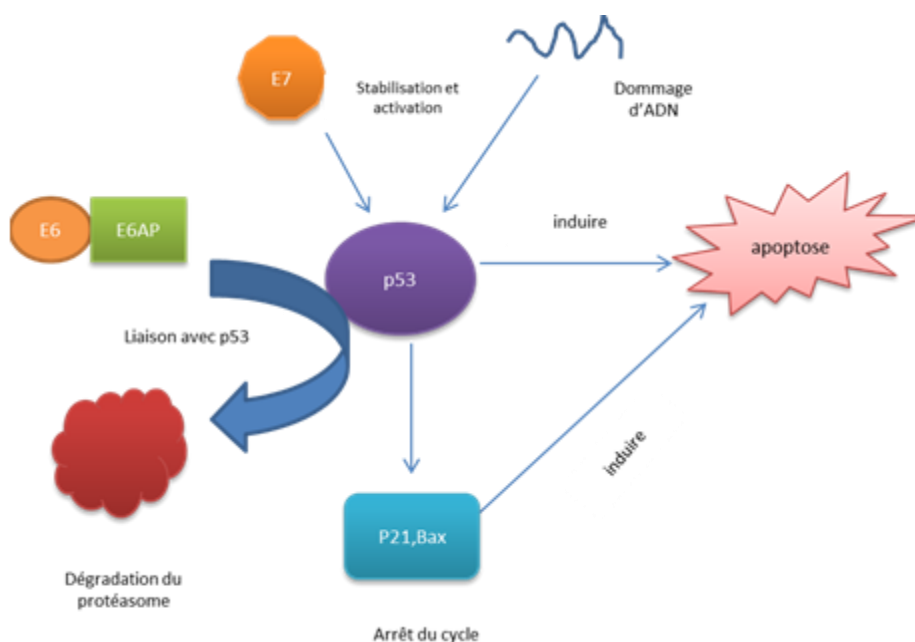


Figure 2-8. Inhibition de la protéine suppresseur p53 par l'oncogène E6

La protéine p53 est responsable de l'activation de l'apoptose. Lors de l'infection virale (VPH), l'oncogène E6 s'attache à la protéine E6-AP et le complexe E6-E6AP dégrade la protéine p53. Alors, la cellule ne peut plus activer la voie apoptotique, et sa prolifération devient incontrôlée (57).

2.2.6. Mécanisme de l'évolution du cancer du col utérin

La présence de plusieurs types de VPH dans le col de l'utérus est liée fortement au développement des NCI (Néoplasie Cervicale Intra-épithéliale) et de cancer invasif (58-60). Les deux types les plus incriminés sont les VPHs 16 et 18 qui sont responsables de la majorité des cas de cancer du col utérin dans le monde et surtout dans les pays développés (61). Cette maladie touche aussi les pays africains y compris Madagascar avec un taux de 17 à 18 % de femmes atteintes de ce cancer (62, 63). Les chercheurs ont illustré qu'il y a une forte relation entre le VPH cancérogène et le taux élevé du NCI. La prévalence des porteurs du VPH à haut risque est plus élevée chez les individus de 30 ans et moins, et elle diminue chez les femmes de plus de 30 ans (64). Les cellules cibles du virus sont les cellules basales de l'épithélium métaplasique (65). Lors d'une infection persistante, le génome viral s'incorpore

avec le chromosome de la cellule hôte. Si le malade ne commence pas le traitement, les lésions précoces de faible degré envahissent toute l'épaisseur de l'épithélium. Elles se propagent vers la membrane basale et se convertissent en cancers invasifs (Figure 2-9). Ensuite, les cellules cancéreuses se diffuseront aux organes et tissus avoisinants et puis vers les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour finir vers les ganglions et les organes plus éloignés (58).

a. Relation entre le NCI et le cancer invasif

La période d'incubation de la maladie cervicale est très longue à partir de l'état préinvasif qui est présenté par des différents degrés de néoplasie cervicale intraépithéliale (NCI) jusqu'à l'évolution d'un carcinome invasif (Figure 2-9) (36, 60). Aucun symptôme n'apparaît chez les femmes porteuses de NCI. Seul l'examen histopathologique nous permet de confirmer l'existence de NCI dans le col utérin de la femme. En plus, une NCI se trouve sous forme de cellules indifférenciées composées d'un noyau volumineux, une intensité accrue de la coloration nucléaire, un polymorphisme nucléaire avec un noyau de taille variable et un cytoplasme restreint (36, 66, 67). La classification du degré de NCI dépend de la proportion de l'épaisseur de l'épithélium contenant la tumeur. Dans le cas de NCI1, seules les couches les plus profondes de l'épithélium sont touchées. La NCI2 a eu lieu quand il y a des altérations cellulaires dysplasiques confinées à la moitié ou aux deux tiers inférieurs de l'épithélium avec une dégradation plus nette que celui du degré 1. Pour la NCI3, la différenciation et la stratification ont presque disparu, mais les anomalies nucléaires submergent la totalité de l'épaisseur de l'épithélium.

b.Lésions NCI transitoires

Les lésions de NCI sont traitables et transitoires (36, 67) . C'est-à-dire qu'elles peuvent disparaître au bout de quelques temps et ne se convertissent pas nécessairement en formes dangereuses. Par contre, les NCI de haut degré (NCI2 et NCI3) peuvent s'aggraver vers un cancer invasif (Figure 2-9.). La période d'incubation est comprise entre 25 à 30 ans avant de devenir une tumeur maligne (60).

c . Cancer envahissant

Le cancer invasif du col utérin est défini comme une tumeur maligne qui est en état grave (Figure 2-9). Les symptômes les plus fréquents sont : saignement intermenstruel, saignement post coïtal, pertes vaginales abondantes séropurulentes, cystite récurrente, douleurs dorsales et pelviennes, œdème des membres inférieurs, obstruction urétérale, occlusion intestinale, dyspnée provoquée par une forte anémie et à une cachexie (36, 68). Les cancers plus évolués peuvent provoquer des tumeurs qui ressemblent à un champignon ou à un chou-fleur avec des pertes vaginales purulentes et puantes qui ne se manifestent jamais à la surface. Lorsque la prolifération de la cellule tumorale continue, la tumeur peut attaquer le vagin et les autres organes voisins. En plus, au cas où l'urètre se rétrécit, la patiente peut avoir un problème rénal sérieux. Ensuite, le cancer ne cesse de se multiplier; il envahit les ganglions lymphatiques et se propage vers les organes plus éloignés puis finit par la formation des métastases (36).

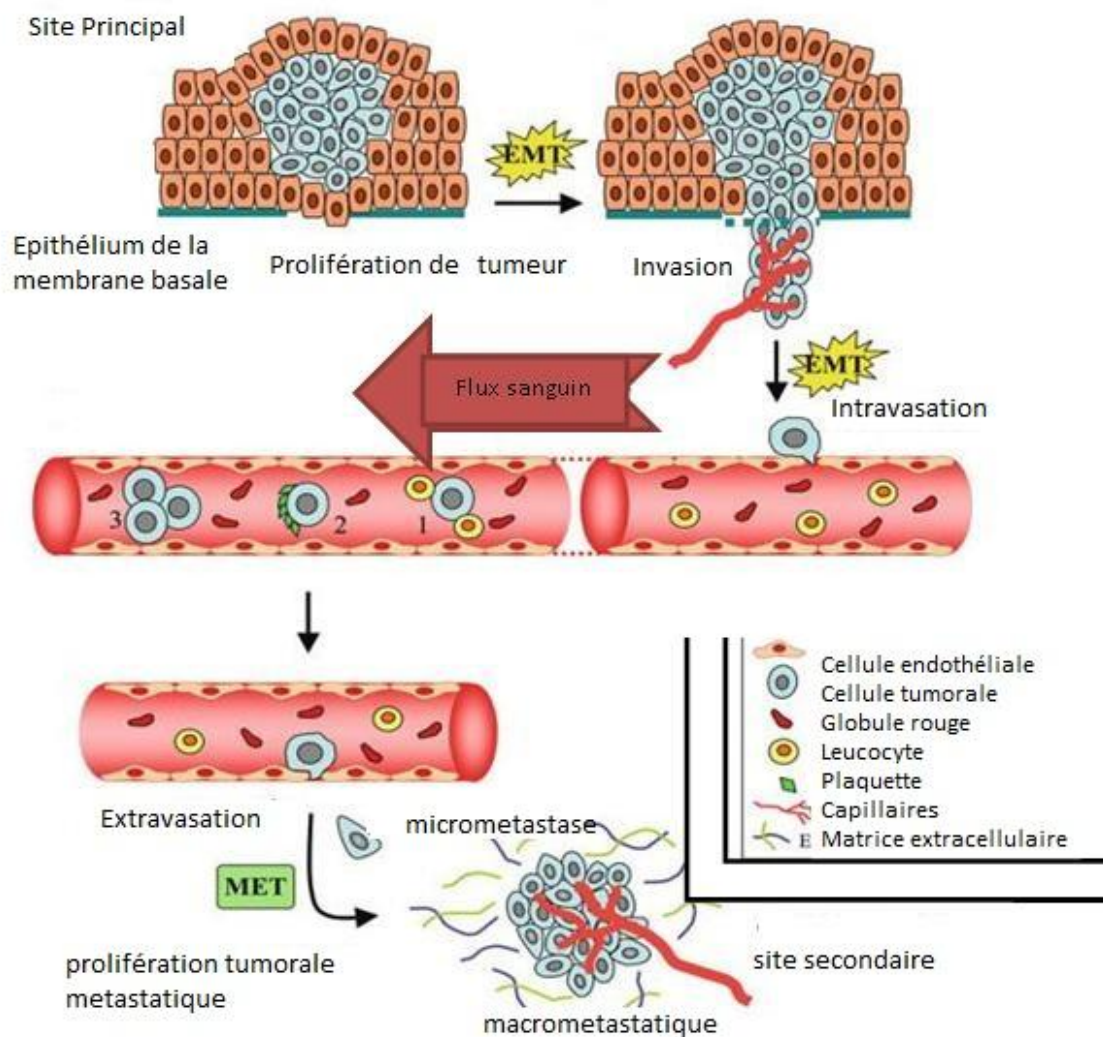


Figure 2-9.Évolution du cancer

Les différentes étapes de l'altération de la cellule normale jusqu'à la formation du cancer invasif (69)

2.2.7. Traitement et prévention de VPH

Les deux vaccins Gardasil® de Merck et Cervarix® de GlaxoSmithKline sont utilisés pour traiter l'infection virale due au VPH. Ces deux vaccins contiennent les protéines virales L1, L2 de VPH et protègent les cellules voisines non infectées contre les attaques de ce virus.

Le Gardasil® est un vaccin quadrivalent qui peut être utilisé pour combattre l'infection des quatre génotypes viraux comme les VPH 6 et 11 qui sont responsables des verrues génitales bénignes et le VPH 16 et 18 qui sont responsables de tumeur maligne (70, 71). Par analogie, le Cervarix® est un vaccin bivalent qui lutte contre les attaques des virus carcinogènes VPH 16 et 18 (70, 72).

3.0. Modèles de réversion tumorale pour un nouveau traitement du cancer du col utérin

3.1. Étude de la réversion tumorale du cancer

3.1.1. Définition du terme réversion

En génétique moléculaire, le terme « réversion » désigne une régénérescence d'un phénotype parental dans les organismes mutés. Prenons l'exemple d'une mutation ponctuelle : il y a une réparation d'une séquence nucléotidique mutée pour redevenir normale. Dans la recherche scientifique concernant le cancer, le terme « réversion » indique le phénomène de la récupération d'un phénotype normal au milieu d'une population cellulaire transformée. Dans ce dernier cas, on ne peut pas confirmer que la réversion tumorale est due au changement de la séquence nucléotidique (73), mais les cellules qui acquièrent leur phénotype parental normal sont appelées cellules révertantes.

3.1.2. Caractéristique de la cellule révertante

D'après les explications ci-dessus, les cellules révertantes peuvent être reconnues par le retour au phénotype parental normal afin de quitter leur état malin. Ces cellules révertantes sont des cellules filles qui proviennent de la conversion spontanée de cellules tumorales et qui possèdent un phénotype différent et moins tumorigène que celles des cellules parentales tumorales (74). Notamment, les cellules révertantes ne peuvent pas proliférer dans un milieu contenant une faible concentration de sérum ou en absence d'adhésion à un substrat extracellulaire. Les cellules révertantes perdent aussi leur capacité à former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris, et récupèrent l'inhibition de contact (75).

3.2. Obtention des cellules révertantes à partir de l'utilisation de différents agents sélectifs

3.2.1. Virothérapie

Il y a plus de vingt ans, les chercheurs ont découvert que plusieurs virus ont un effet oncosuppressif. Citons parmi eux, le virus de l'herpès simplex (HSV) qui fut le premier virus identifié en laboratoire en 1991 ayant une propriété oncolytique (76). Ensuite, il y a l'effet cytolytique de l'adénovirus découvert en 1996. Même si ces deux virus sont connus comme pathogènes chez l'être humain (76), ils sont très importants dans le contexte de la thérapie anti-cancéreuse. Lors de l'utilisation des virus oncolytiques, la plupart des cellules cancéreuses meurent, mais certaines d'entre elles deviennent résistantes aux effets cytolytiques. Parmi les cellules résistantes aux virus oncolytiques, on peut sélectionner des cellules révertantes à l'aide de l'agar mou. Alors, le virus oncolytique est utilisé non seulement pour tuer les cellules malignes, mais ils sont importants comme outil de sélection des cellules révertantes. Pour cette raison, nous allons élaborer la relation existante entre les virus oncolytiques et les cellules révertantes.

Voici ci-dessous un tableau qui illustre les différents types de virus oncolytiques intéressants à l'obtention des cellules révertantes.

Tableau 1. Sélection des cellules révertantes par l'utilisation des virus oncolytiques

Agent sélectif	Gène modifié	Mécanisme d'action
Parvovirus	Gène HSP70, HSP72 Gène du TCTP et sub-G1	Réduction des protéines (HSP70 et 72) pour activer la voie apoptotique Inhibition de TCTP et régulation du cycle cellulaire
Le virus de l'Herpès simplex: HSV1790 + promédicament	Gène inconnu	Phénomène d'oxydo-réduction Réduction de la tumeur en amenant la replication effrénée de l'ADN
Adénovirus ad-DCL1	DCL1 (responsable de la prolifération cellulaire)	Restauration du gène DCL1 via le site alpha-caténine Empêchement de la formation de la tumeur
Adénovirus ad-TSLC1	TSLC1 (gène suppresseur de tumeur qui contrôle la prolifération cellulaire)	Restauration de ce gène Processus inconnu
Réovirus T3V1, T3V2	Inconnu	Inconnu
Rougeole atténuée	Inconnu	Activation des composantes du système immunitaire Formation de syncytium

L'utilisation de virus oncolytiques en tant que stratégie expérimentale d'inhibition de la prolifération de la cellule tumorale est basée sur la capacité de ce virus d'infecter, se répliquer, et s'accumuler dans les cellules cancéreuses. Le virus modifie alors le comportement de la cellule cancéreuse infectée. Ces virus peuvent ainsi se disperser dans toutes les cellules malignes voisines sans endommager les cellules normales (77).

Les virus oncolytiques sont classés en deux catégories : 1) les virus ayant des propriétés naturellement oncolytiques comme le parvovirus (73, 78-80) et le HSV1 (81) , et 2) les virus qui contiennent des gènes modifiés comme les virus de l'herpès simplex HSV1716, HSV1790 (82), l'adénovirus ad-DLC1(83) , certains réovirus atténués (84) et certains virus de rougeole atténués (85).

a Les virus naturellement oncolytiques qui se relient au concept de la réversion tumorale

Le parvovirus :

Parmi les virus qui ont un effet oncolytique naturel, des chercheurs ont souligné l'efficacité du parvovirus pour obtenir la réversion tumorale. Plusieurs espèces de parvovirus sont identifiées et la plupart d'entre elles ont un effet cytotoxique envers la cellule tumorale. Plusieurs cancers sont traitables avec le parvovirus, y compris le cancer du cerveau (gliome, médulloblastome, méningiome) (78), les neuroblastes (79), les mélanomes et les cancers gastro-intestinaux. Par contre, la vertu oncolytique du parvovirus est limitée pour certains cancers. Notamment, l'effet nocif du parvovirus est transitoire pour le cancer du côlon (73) et l'hémangiosarcome (80).

La réversion de la cellule tumorale est due à l'activation de l'apoptose après l'infection parvovirale (73, 79). Le rétablissement de l'apoptose est relié à la réduction des niveaux des protéines du choc thermique HSP70 (*heat shock protein 70*), et HSP72 (86). La présence des

protéines HSPs dans la cellule tumorale est bénéfique pour cette cellule parce qu'elles ont des fonctions multiples. Elles distribuent les nouvelles protéines dans différentes cellules, sont responsables du repliement des protéines dans certaines organites, dissocient certains complexes de protéines, participent à la régulation d'autres protéines et enfin contrôlent la voie apoptotique (87). Les protéines HSP70 et HSP72 sont des exemples des protéines HSP qui ont pour fonction d'inhiber l'apoptose (88). Ce rehaussement de l'expression est détectable dans plusieurs types de cancer. Par contre, une réduction de l'expression des protéines HSP70 et HSP72 est détectée dans les cellules révertantes traitées avec le parvovirus. Par conséquent, l'inhibition des protéines HSP70 et HSP72 semble participer au phénomène de la réversion tumorale.

Dans certains cas, l'activation de l'apoptose est reliée à l'inhibition de la protéine TCTP (*translationally controlled tumor protein*). La protéine TCTP est une protéine multifonctionnelle. L'une de ses fonctions est d'induire un effet anti-apoptotique (73). Rappelons que les changements génétiques constituent l'une des causes de la cancérisation. Dans plusieurs cellules cancéreuses, le niveau de la protéine TCPT est élevé. Ainsi, la surexpression de la protéine TCTP joue un rôle d'oncogène car la cellule perd sa capacité d'induire la mort cellulaire pour les cellules inutiles ou ayant un dommage à la séquence génomique. Par contre, les cellules révertantes sélectionnées par le parvovirus H1 contiennent un faible niveau de la protéine TCTP. Le parvovirus H1 est alors capable d'inhiber cette protéine. L'inactivation de cette protéine est reliée à la stimulation de l'apoptose car des cellules fragmentées sont détectées en sub-G1. Grâce à ce mécanisme, les cellules tumorales de cerveaux traitées *in vivo* et *in vitro* avec le parvovirus ont acquis leur état normal. La rémission de ces cellules est vérifiable à partir de l'obtention des clones dérivés qui ne poussent pas sur l'agar mou (78). Ces clones révertants dérivés des cellules

tumorales de cerveau demeurent stables parce qu'ils peuvent vivre plus de 5 ans sans retourner à l'état malin (78). Le cancer du neuroblaste est aussi traitable avec le parvovirus H1. La microscopie de fluorescence a confirmé que ce virus peut pénétrer ce type de cellule cancéreuse et s'incorporer dans le génome de la cellule hôte. La conversion de la cellule cancéreuse en cellule normale est très rapide parce que huit des clones révertants sont apparus après la destruction de la cellule cancéreuse. La réversion de ces cellules est le résultat de l'activation de la voie apoptotique (79).

Le parvovirus est aussi recommandé pour le traitement du mélanome et du cancer du côlon (73). Des cellules révertantes ont été isolées lors de l'exposition de lignées cellulaires malignes du mélanome et du côlon (SK-290Mel-1, MZ-MeL2 et Sk-Mel94, LS10-34, DLD-1) au parvovirus H1 (73). Ce parvovirus peut infecter ces cellules et ceci est mis en évidence par la détection de la protéine virale NS1 à l'aide de l'immunobuvardage Western. Cependant, la sensibilité de ces cellules n'est pas la même. Certaines lignées cellulaires comme LS10-34 sont plus résistantes à ce virus (73). Ensuite, les clones CL4 et CL6 dérivés de la lignée cellulaire DLD-1 et qui ont été obtenus à partir de l'infection parvovirale de ces cellules cancéreuses du côlon ne pouvaient croître en milieu d'agar mou, confirmant qu'ils ont adopté un phénotype normal (73). En plus, des analyses complémentaires ont montré que le parvovirus n'est pas toxique chez le lymphocyte et monocyte, c'est-à-dire que ce virus n'est pas nocif pour la cellule normale (73). Ainsi, les clones dérivés du mélanome et du côlon lors de l'infection parvovirale sont des cellules normales.

Le pouvoir cytotoxique du parvovirus est plus limité dans le cas de cancers comme l'hémangiosarcome. Même si le parvovirus peut infecter la lignée cellulaire H5V, cette lignée cellulaire demeure en état malin (80). Le traitement à forte dose virale de la lignée cellulaire

HSV a donc échoué parce qu'elle ne peut pas induire l'apoptose. Pour cette raison, cette cellule est résistante au parvovirus. Par conséquent, d'autres facteurs à part les protéines HSP70 et TCTP peuvent être la cause de la cancérisation.

b Les virus oncolytiques ayant des gènes modifiés

i. Le virus herpès simplex HSV1716 et HSV1790

Plusieurs types de virus oncolytiques sont caractérisés par des gènes modifiés. Le virus herpès simplex HSV1 qui contient un gène modifié a un effet important en ce qui concerne la destruction de la cellule tumorale. Environ 100 espèces de virus herpès sont identifiées. Chaque espèce infecte des cellules hôtes différentes, mais le HSV1 est spécifique des cellules des êtres humains (89). Le HSV1 possède une fonction thérapeutique anti-cancéreuse à cause de sa capacité à se répliquer à l'intérieur de la tumeur, causant ensuite la mort des cellules tumorales. Plusieurs dérivés de HSV1 ayant un effet oncolytique intéressant sont identifiés (90). Parmi eux, le HSV1 qui contient un gène ICPO muté (ICPO a pour fonction d'activer l'enzyme protéasome qui dégrade plusieurs protéines cellulaires) est utilisé pour traiter certains types de cancer comme le cancer du côlon, du sein, de la prostate et du poumon (90). Cependant, le mécanisme de la destruction n'a pas encore été élucidé. De plus, la suppression de certains gènes qui synthétisent l'ICP34.5 et l'ICP47 peut aussi améliorer l'effet oncolytique de HSV1 (91). Les protéines ICP 34.5 et ICP47 sont responsables de la virulence neurale du virus de l'herpès. Leur absence minimise alors l'effet pathogène sur la cellule normale. Autrement dit, ce virus devient spécifique pour la thérapie de la cellule maligne.

Parmi les virus HSV1 atténués, le HSV1716 et HSV1790 ont une caractéristique qui permet d'obtenir des cellules révertantes. Le HSV1716 est un virus herpès obtenu à partir de la mutation du gène RL1 du virus. Ce virus contient une propriété anti-tumorale envers les cancers de gliome, ovarien, du poumon et du sein (91). Suite à la faiblesse du pouvoir anti-tumorigène du HSV1716, les chercheurs ont découvert d'autres moyens pour améliorer sa capacité à induire une cytolysse. Un nouveau virus appelé HSV1790, plus fort que le précédent, exprime un effet cytolytique envers le cancer. Ce dernier est spécialement dû au résultat de l'incorporation de la nitroréductase (NTR) d'*Escherichia coli* dans le gène RL1 du HSV1716 (82). En plus, le NTR active le promédicament CB1954 pour devenir un agent cytotoxique. Par définition, le promédicament est une substance pharmacologique sous forme inactive dérivée d'un produit chimique (92). Le promédicament est utilisé pour améliorer la thérapie via l'augmentation ou la réduction de sa toxicité. Le HSV1790 contient aussi le NTR, mais son effet cytolytique n'est pas suffisant pour tuer les cellules cancéreuses. Par comparaison, l'utilisation du promédicament seul n'a pas de sens dans le traitement des cancers. Par contre, l'assemblage de ces deux thérapies (HSV1790 et CB1954) accentue leurs propriétés oncolytiques respectives et améliore la survie de la cellule révertante. Le HSV1790 a donc besoin d'un activateur pour lyser les cellules tumorales. L'efficacité de cette bithérapie est vérifiable lors du traitement des lignées cellulaires tumorales (3T6, A431) (82). D'ailleurs, celles-ci mènent à l'obtention des cellules révertantes.

Le mécanisme d'action de la bithérapie HSV1790 et CB1954 pour tuer les cellules tumorales est dû au phénomène d'oxydo-réduction. Lors de son introduction à la cellule maligne, la combinaison de cette thérapie libère un nouveau produit nommé hydroxylamine. Ce dernier active une réaction chimique avec l'acétylthioester dans la cellule porteuse en fabriquant un autre produit dérivé de *N*-acétoxy (Figure 3-1). Même si la formation de

l'hydroxylamine est transitoire, ce produit entraîne un effet gravement cytotoxique envers la cellule cancéreuse en scindant la liaison ADN-ADN de la cellule tumorale et en détruisant cette cellule (93).

La transplantation de cellules cancéreuses A431 chez des souris saines confirme l'efficacité de cette bithérapie. Les résultats ont montré que chez les souris traitées avec la combinaison de HSV1790 et le promédicament CB1954, la tumeur a été réduite cinq fois par rapport à celle des souris transplantées par la même cellule traitée avec le HSV1790 (82). L'utilisation de HSV1 atténué avec le produit chimique est une donc bien meilleure façon d'obtenir des cellules révertantes.

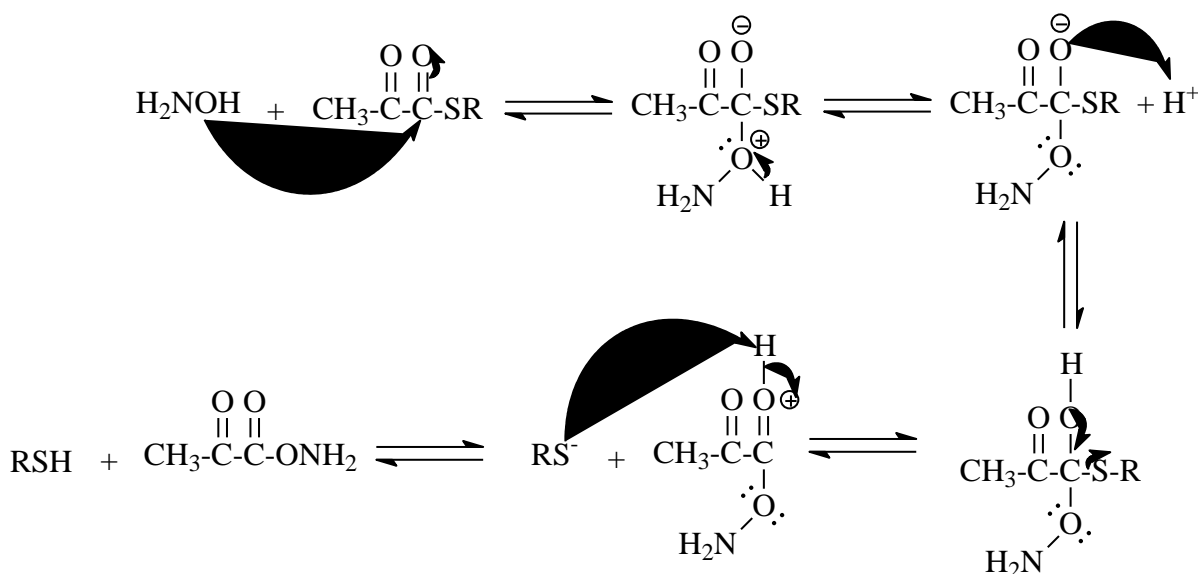


Figure 3-1. Mécanisme réactionnel entre l'hydroxylamine et l'acétylthioester effectué par le promédicament CB1954 dans la cellule cancéreuse

ii. L'adénovirus atténué

L'adénovirus atténué est un autre type de virus oncolytique. La modification du génome de l'adénovirus augmente son effet cytolytique. Ce virus peut provoquer l'apoptose dans la cellule cancéreuse pour corriger son comportement. Premièrement, la capside virale est composée des protéines hexon et penton qui lui permettent de s'attacher à leurs récepteurs cellulaires, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (94). Lors de la réplication virale, l'accumulation de particules virales dans le cytoplasme a un effet cytotoxique via la lyse cellulaire. Deuxièmement, les protéines virales E1A et E1B, qui se lient avec les protéines suppresseurs de tumeurs pRb et p53 respectivement (95), peuvent déclencher l'apoptose et activer le facteur de nécrose tumoral alpha en bloquant les anticorps antagonistes. Par contre, ces protéines virales ne sont pas suffisantes pour détruire les cellules cancéreuses. Des modifications sont effectuées dans son génome pour améliorer l'effet oncolytique. Deux types d'adénovirus ayant un gène modifié (ad-DCL1 et ad-TSLC1) peuvent être utilisés pour traiter certains types de cancers (96).

L'adénovirus ad-DCL1 est une meilleure thérapie pour le cancer de la prostate. Dans la plupart des cancers de la prostate, le gène suppresseur de tumeur DLC1 (aussi appelé *Rho-GTPase activating protein 7* ou *start domain containing protein*.) est bloqué. L'ARNm correspondant au gène DLC1 a une longueur de 6 kb et est composé de 14 exons (97). Ce gène est localisé sur le chromosome 8p21.3-22, régularise la voie transcriptionnelle en évitant l'hyperméthylation, contrôle la prolifération et la morphologie de la cellule et empêche la formation de la tumeur et de la métastase en agissant comme un suppresseur de tumeur (97, 98). La perte de ce gène dans les cellules cancéreuses de la prostate est liée au rehaussement du taux de méthylation et à la déacétylation des histones qui maintiennent la

voie transcriptionnelle (99). Par conséquent, l'absence de ce gène bouleverse la prolifération de la cellule (100). L'exposition de la cellule cancéreuse de la prostate à l'ad-DLC1 entraîne alors une récupération de la fonction de cette protéine DLC1 dans cette cellule maligne. La restauration de cette protéine dans la cellule maligne de la prostate conduit non seulement à la récupération de sa fonction, mais elle augmente la probabilité d'obtenir des cellules révertantes. Les cellules cancéreuses de la prostate reprennent donc leur phénotype normal. Cette rémission de la cellule est confirmée par le test à l'agar mou (96).

Le mécanisme d'obtention de la cellule révertante dépend de la capacité de la protéine DLC1 à maintenir le mouvement cellulaire et d'activer la voie apoptotique. La protéine encodée par ce gène s'attache à la cellule via des sites alpha-caténines. La région 340 jusqu'à 630 de la protéine DLC1 est riche en sérine qui lui permet de s'attacher à la région 117 jusqu'à 161 de l'alpha-caténine (101). La lignée cellulaire C4-2B2 de la prostate est riche en alpha-caténines, mais le gène DLC1 est absent. L'infection de cette cellule par l'ad-DLC1 crée une liaison entre l'alpha-caténine de la cellule et la protéine DLC1. Cette restauration de l'activité DLC1 dans la cellule réactive la voie apoptotique et normalise la cellule maligne. Par contre, le pouvoir oncolytique d'ad-DLC1 est limité. Aucune cellule révertante n'est observée dans la lignée cellulaire de prostate PC3. L'absence du gène DLC1 et des régions d'alpha-caténine est notée dans cette lignée cellulaire (101). Le DLC1 porté par l'adénovirus reste en état libre lors du traitement de cette cellule avec le vecteur ad-DLC1 à cause de l'absence de ce site alpha-caténine. Par conséquent, la cellule PC3 n'est pas traitable avec cette thérapie. D'après ce concept, le pouvoir cytolytique de l'ad-DLC1 dépend de la présence du site d'attachement de DLC1 à la cellule tumorale.

Comme cela a été mentionné ci-dessus, l'ad-TSLC1 est un autre type d'adénovirus ayant un gène modifié qui a une propriété thérapeutique anticancéreuse. Le gène TSLC1 est un suppresseur de tumeur qui participe au déroulement de la synthèse d'ARN en empêchant l'hyperméthylation (102, 103). La protéine TSLC1 s'attache à la cellule par la liaison homophile avec le calcium et le magnésium (103). La TSLC1 est une protéine transmembranaire dimérique. Le gène encodant cette protéine suppresseur de tumeur est localisé dans le chromosome 11q23.2 (104). La protéine TSLC1 est composée de 442 acides aminés, et des travaux récents montrent que les niveaux de cette protéine sont très bas dans certains cancers dont ceux de l'œsophage, le col utérin cervical, du nasopharynx et le mélanome. Alors, l'inhibition de la protéine TSLC1 est en partie responsable de la cancérisation (105). L'inactivation de cette protéine est détectable aussi dans le cancer du poumon. Le traitement d'une lignée cellulaire maligne du poumon A549 par l'ad-TSCL1 est suffisant pour causer la réversion de cette cellule. Durant la réplication de l'adénovirus, le taux d'expression du gène TSLC1, et les niveaux de la protéine TSLC1, augmentent dans la cellule. Cette quantité croissante est détectable dans la cellule *in vitro* avec une réduction de 28% de la viabilité de la cellule maligne (104). Le test *in vivo* confirme aussi l'efficacité de ce traitement. Le transfert de ce gène dans la cellule A549 stimule l'apoptose (83). Cette corrélation entre l'apoptose et l'abondance de la protéine TSLC1 conduit à la réversion de la cellule tumorale.

iii. Réovirus atténué

L'utilisation de réovirus atténués oncolytiques est une autre façon d'obtenir une cellule révertante. Le réovirus humain est classé en trois sérotypes (T1L, T2J et T3D). Parmi ces trois types, le T3D a une capacité plus élevée que les autres pour détruire la tumeur (84). Deux

réovirus oncolytiques atténués (T3v1 et T3v2) dérivés de T3D par la modification de leurs protéines λ_2 et δ_1 , respectivement, sont utilisés pour le traitement du cancer. Le réovirus est un virus à ADN dont son génome est segmenté et composé de 10 fragments. Les réovirus atténués comportent le même nombre de fragments de génome par rapport au réovirus normal, mais ils sont différenciés par la mutation de leur génome. Le T3v1 possède une seule mutation dans les segments L1, L2 et L3 et dans le segment S1 pour le cas de T3v2 (84). Le réovirus n'est pas pathogène pour l'être humain ni pour la cellule fibroblaste normale. Cependant, il peut pénétrer dans différents types de cellules malignes, y compris la cellule NIH3T3 transformée. Ce virus infecte les cellules qui contiennent de hautes concentrations en acide sialique via le récepteur EGF (*epidermal growth factor*). Son effet oncosuppressif est très élevé dans la plupart des cancers humains. L'adhésion du réovirus est très facile dans les cellules cancéreuses parce que la majorité des cancers portent une grande quantité de récepteurs EGFR et ErbB2 (apparenté à EGFR) (106). Ensuite, la protéine Ras, proto-oncogène qui participe à la régulation de la prolifération, à la différenciation et à la survie de la cellule, est inhibée dans la cellule tumorale du pancréas, du poumon et du côlon, et est réactivée suite à l'infection par le réovirus (107, 108, 109). Une autre possibilité est que le taux élevé de EGFR dans le pancréas cause une abondance des molécules VEGF et IL-8 impliquées dans la proangiogenèse. La présence du réovirus dans cette cellule cancéreuse du pancréas régule ces molécules, mais les processus sous-jacents ne sont pas encore identifiés.

Même si les réovirus peuvent induire un effet oncolytique, cette thérapie n'est pas suffisante pour certains cancers. Précédemment, nous avons discuté de trois types de réovirus. Nous avons mentionné que le type T3D s'adapte mieux à la cellule tumorale. Cette expérience montre que le taux de mortalité de la cellule cancéreuse demeure faible en

augmentant la dose du réovirus. En le comparant avec les virus mutés, le virus T3v2 est plus destructif que le T3v1 durant le traitement *in vitro* de la cellule cancéreuse (84). Ce dernier est plus actif que le réovirus naturel T3wt. Par contre, le réovirus T3v1 soigne mieux que le T3v2 en utilisant le traitement *in vivo*. La raison pour laquelle cette différence reste inconnue est qu'il n'est pas relié à la rapidité de la réplication virale, ni à la transcription ou à la quantité de protéines produites (84).

iv. Virus de la rougeole atténué

Le virus de la rougeole (*measles virus* -MV) atténué fait partie de la catégorie des virus oncolytiques modifiés. Ce virus est un curatif médical intéressant pour la rémission de la cellule tumorale. Ce virus attaque la cellule hôte via le récepteur cellulaire CD46. La protéine virale impliquée est composée de l'assemblage des hémagglutinines et de la protéine de fusion (F) qui induisent un processus de syncytium lors de l'attachement du virus à la membrane cellulaire. Le problème est que le virus de la rougeole est pathogène et très contagieux pour l'être humain. Il se propage par voie aérienne. Au début, il se développe dans l'appareil respiratoire. Ensuite, il envahit les autres organes comme les ganglions lymphatiques, le foie et le tube digestif. Cette maladie peut devenir très grave et entraîner des morts.

Même si le virus de la rougeole provoque des maladies sévères, son dérivé atténué a un effet thérapeutique anti-cancéreux intéressant et tolérable. Le virus de la rougeole atténué est déjà utilisé pour traiter différents types de cancer (gastro-intestinal, cervical, sein) (110). En général, le virus de la rougeole naturel pénètre dans la cellule maligne via les récepteurs CD150. Par contre, le virus de la rougeole atténué adhère facilement au récepteur CD46 (85). Dans la majorité des cancers, le récepteur CD46 est très abondant, ce qui donne plus de

chance au virus de la rougeole atténué de s'intégrer dans la cellule tumorale. Dès que ce virus arrive à la cellule cancéreuse, il active le système immunitaire, plus particulièrement les cellules T, B, les monocytes et les macrophages (85). L'activation de ces composantes du système immunitaire aide les cellules à détruire les agents infectieux. Par contre, dans le cas du neuroblastome, l'évolution du cancer n'est pas reliée à la surexpression du CD46, mais le virus de la rougeole atténué est toujours capable d'infecter ces types de cellules cancéreuses. Le processus de la correction du comportement de ces cellules ne dépend pas du mode d'attachement (85). D'autres recherches montrent aussi que le virus de la rougeole atténué inhibe certaines composantes du système immunitaire comme les interférons. Le rétablissement de l'apoptose ne concerne pas les interférons. Cependant, les virus de la rougeole peuvent tuer les cancers via la formation de syncytium. En comparant la capacité du virus de la rougeole naturel et du virus de la rougeole atténué, ce dernier donne plus d'avantages au traitement des cellules *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, le mécanisme n'est pas encore bien compris (110). Ainsi, l'emploi du virus de la rougeole atténué pour soigner le cancer suscite beaucoup d'espoir en ce qui concerne la réversion tumorale.

3.2.2. Chimiothérapie

L'exploitation des produits chimiques pour traiter des maladies a commencé durant les années 1900 (111). Par contre, les chercheurs ont hésité à utiliser directement ces médicaments pour traiter les personnes atteintes du cancer. Ils effectuaient tout simplement des expériences *in vivo* et *in vitro*. Cependant, les scientifiques ont découvert par hasard un produit chimique anticancéreux durant la 2^{ème} guerre mondiale. Un jeune militaire italien atteint d'un lymphome a été exposé au gaz moutarde au cours de combats. Plusieurs jours après son opération chirurgicale, les médecins ont remarqué que son taux de globules blancs avait réduit progressivement. À cette époque, les chercheurs ont vérifié

l'effet thérapeutique du gaz moutarde en injectant ce produit dans des souris auxquelles on avait préalablement transplanté des cellules de lymphome humain. Ces chercheurs ont alors observé une régression de tumeur dans ces souris malades. Par la suite, les médecins ont commencé à inoculer ce produit dans le sang des patients qui étaient atteints de lymphome non-hodgkinien (111). Plusieurs patients ont alors été guéris. Cette expérience encouragea les scientifiques à utiliser d'autres produits chimiques ayant un effet thérapeutique anticancéreux.

De nos jours, la chimiothérapie anticancéreuse prend toujours une grande place dans la recherche. D'après plusieurs expériences, ces produits ont une capacité de tuer les cellules tumorales. En plus, des études montrent que certains d'entre eux ont comme propriété de causer la réversion de la tumeur vers un phénotype normal (115). Citons les exemples suivants (tableau 2) pouvant provoquer une rémission de la cellule tumorale: le méthanesulfonate d'éthyle (EMS- Figure 3-2), la déoxyuridine (Figure 3-3), la nitronitrosoguanidine de méthyle (MNNG- Figure 3-4), le dasatinib (112), l'acide suberoylanilide hydroxamique (Figure 3-5), et certaines plantes médicinales comme le SJSZ (*styrax japonica Siebold et al Zuccarini* (herbe d'origine chinoise et coréenne) (113).

Tableau 2. Produits chimiothérapeutiques causant la réversion de cellules tumorales

Agent sélectif	Gène modifié	Mécanisme d'action
méthanesulfonate d'éthyle (EMS)	Gène XRCC1	Augmentation du nombre de copies de ce gène
Désoxyuridine	Inconnu	Réduction de dihydrofolate réductase
Dasatinib	Inconnu	Phénomène anti-angiogénèse
Protéine connexine 43	Gène de la connexine 43	Restauration de cette protéine
acide suberoylanide hydroxamique (SAHA)	Gène de la protéine p53	Restauration de l'acétylation des histones qui normalise la voie transcriptionnelle
Plante médicinale SJSZ	Gène des protéines ERK et p38MAPK	Diminution de l'expression et de l'activité de ces protéines

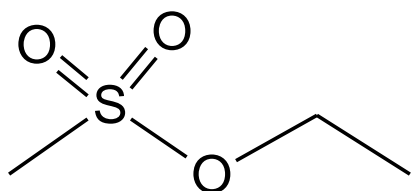


Figure 3-2 : Structure du méthanesulfonate d'éthyle

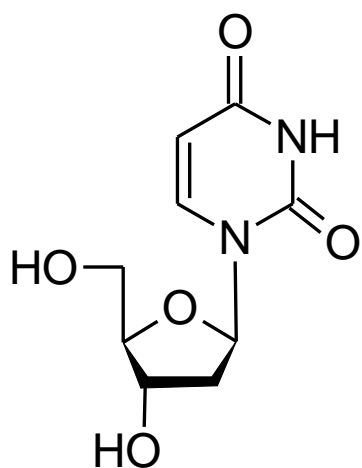


Figure 3-3. Structure de la désoxyuridine

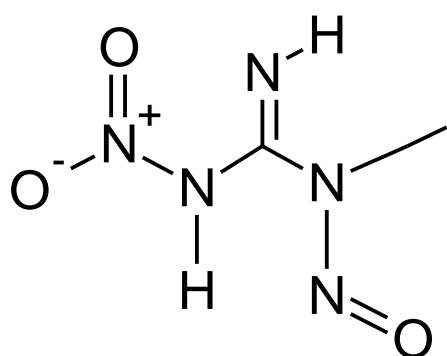


Figure 3-4. Structure de la nitrosoguanidine de méthyle

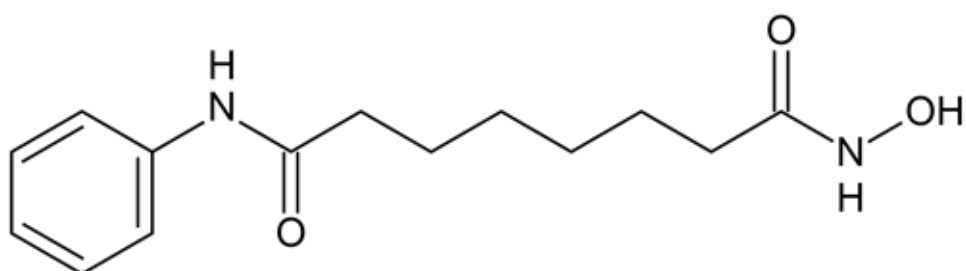


Figure 3-5. Structure de *Suberoylanilide hydroxamic acid*(SAHA)

a. Réversion due au changement de la séquence d'ADN

La réversion tumorale peut être due à la restauration de certains gènes dont l'activité est très diminuée dans les cellules tumorales. Prenons l'exemple de la lignée cellulaire EM9 (cancer de l'ovaire). Le taux d'activité du gène XRCC1 est très faible dans cette cellule. Puis, ce gène est connu pour sa fonction de réparation des cassures dans les molécules d'ADN. Il est associé aux complexes protéines-protéines qui s'associent aux enzymes ADN polymérases. Ces enzymes contiennent d'ailleurs des molécules de zinc qui leur permettent de détecter les ADN brisés (114). L'exposition de la cellule EM9 au produit chimique EMS (Figure 3-2) augmente le taux du gène XRCC1 dans cette cellule. Des cellules révertantes (CA9, CA2, CA6) ont été isolées à l'aide de cette méthode : ces cellules sont caractérisées par leur morphologie semblable à la cellule normale et pour leur incapacité de proliférer dans l'agar mou (115). Ces cellules révertantes contiennent la protéine XRCC1 en abondance (115). Le rétablissement de la protéine XRCC1 dans la cellule tumorale EM9 lors de l'utilisation d'EMS est donc relié à la réversion tumorale.

Les clones révertants dérivés de la lignée EM9 lors de l'exposition à l'EMS demeurent invariables. Un test de la sensibilité de la cellule EM9 a été effectué pour déterminer si d'autres produits chimiques tels le MNNG (nitronitrosoguanidine de méthyle-Figure 3-4) peuvent modifier le comportement de la cellule tumorale EM9. Ce test montra que les choix de produits chimiques pour le traitement de la cellule EM9 sont multiples, parce que des cellules révertantes sont obtenues. Malgré l'abondance de choix du produit, les cellules révertantes dues au traitement de l'EMS sont plus stables que celles exposées au MNNG (115).

Par ailleurs, l'obtention de ces cellules révertantes peut être due à des changements génétiques. Le produit chimique EMS a une caractéristique mutagène : il peut modifier la séquence de base de l'ADN. Certaines expériences démontrent que l'utilisation d'une forte dose d'EMS peut provoquer plusieurs mutations. La plupart d'entre elles sont dues au changement de la paire de base G : C en A : T. À cause de ces mutations, certains ADN récupèrent spontanément leur génotype normal. Cette normalisation peut être reliée au rehaussement du gène XRCC1. Par conséquent, les clones révertants dérivés des cellules tumorales EM9 seraient dus à une ou plusieurs mutations spontanées.

b. Cellule révertante obtenue par le contrôle de l'expression génomique

Des cellules révertantes peuvent être obtenues suite à l'effet oncolytique de l'agent chimique désoxyuridine (Figure 3-3). L'exposition de la cellule tumorale CHO (*chinese hamster ovary cell*) à cet agent peut réduire le taux de dihydrofolate réductase (DHFR) (116). Cet enzyme est essentiel à la synthèse des bases purines et de la thymidine, composantes essentielles de l'ADN (117). Alors, l'abondance de cet enzyme est reliée à une augmentation des niveaux intracellulaires de ces bases, ce qui contribue à l'immortalisation de la cellule. Par contre, la réduction de la DHFR est due à l'effet de la désoxyuridine qui peut modifier la séquence d'ADN. Certains ADN acquièrent leur phénotype normal d'où l'obtention des clones révertantes qui peuvent maîtriser leur prolifération. Conséquemment, la capacité de la cellule CHO à contrôler l'expression d'ADN mène à l'obtention de la cellule normale.

c. Réversion tumorale due à l'activation de la voie apoptotique

Comme la virothérapie, certains produits chimiques activent la voie apoptotique de la cellule tumorale. Par exemple, le dasatinib a pour fonction d'empêcher la communication entre la cellule HUVEC (*human umbilical vascular endothelial cells*) et les protéines VEGF et

BFGF, qui sont responsables de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (112). Autrement dit, le dasatinib a une propriété anti-angiogénèse qui contrôle la croissance de la cellule maligne. Ce produit est aussi un inhibiteur du gène SRK (*S-receptor Kinase*) (112) et il bloque la néoformation de métastase. Alors, l'injection de dasatinib dans la cellule tumorale tue les cellules malignes via l'activation de l'apoptose. Après la suppression des cellules cancéreuses, il y a apparition de certaines cellules résistantes à ce produit, incluant des cellules normales. Le traitement des cellules tumorales endothéliales avec ce produit est un exemple de la cellule qui acquiert son phénotype normal lors de son test de vérification avec des souris saines parce ce qu'il ne provoque pas de tumeur dans cette souris (112).

La protéine connexine 43 est une autre molécule utilisable pour le traitement du cancer, surtout pour le cancer du cerveau. Des expériences montrent que les niveaux de cette protéine sont très faibles dans la cellule tumorale par rapport à la cellule normale (118). Dans la vie cellulaire, cette protéine joue un rôle crucial à la formation de jonctions communicantes (*gap junction*), une structure responsable de la transmission du signal entre cellules. Elle participe aussi à la régulation de la division cellulaire et à leur développement (119). L'expression de cette protéine dans la cellule maligne du cerveau suite à une transfection réduit son pouvoir tumorigène. La normalisation de la cellule est vérifiable à l'aide du test *in vitro* parce que la cellule transfectée a une morphologie plate et translucide et n'adhère pas à l'agar mou. La connexine 43 est aussi un bon traitement *in vivo* puisque son expression supprime la formation de tumeurs chez la souris (118). Alors, la restauration de cette protéine dans la cellule cancéreuse du cerveau rétablit la communication intercellulaire et stimule la perte de phénotype malin.

Certains produits chimiques tel l'acide suberoylanide hydroxamine (SAHA- Figure 3-5) ont la capacité d'empêcher la prolifération de la cellule cancéreuse de la prostate. La stabilité de la croissance de la cellule est due à l'activation de la voie apoptotique via la restauration d'histone acétylée par l'inhibition des histones déacétylases (120) ce qui normalise la voie transcriptionnelle (121). Plusieurs histones acétyl-transférases agissent comme co-activateurs de la protéine p53 durant la réparation d'ADN endommagé (122). Donc, la carence en histone acétyl-transférase bouleverse la réplication d'ADN et la transcription d'ARN. Par conséquent, des mutations ou des cassures peuvent s'accumuler dans l'ADN génomique, qui contribuent à l'immortalisation de la cellule. Par contre, après l'inactivation des histones déacétylases de la cellule tumorale de la prostate par l'introduction de SAHA, la protéine p53 est réactivée et la cellule est capable de détecter les dommages dans la séquence d'ADN via la réactivation de la protéine p53 (123). Alors, la cellule acquiert son phénotype atténué, d'où la réversion tumorale.

d. Obtention des cellules révertantes via la régulation de la croissance cellulaire.

La phytothérapie a aussi une caractéristique génotoxique. Traditionnellement, la plante SJSZ (*styrax japonica Siebold et al Zuccarini*) est utilisée pour guérir les maladies de gorges et d'odontalgie, la toux, et les paralysies (113). D'ailleurs, le fruit de cette plante contient des glycoprotéines oncolytiques essentielles au traitement du cancer. C'est pourquoi, l'extrait de glycoprotéines fut utilisé au laboratoire pour traiter les cellules cancéreuses. Cette glycoprotéine a pour fonction de diminuer l'activité des protéines ERK (*extracellular signal regulated kinase*) et p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Ces deux enzymes sont responsables de la modification de la cellule. L'enzyme ERK joue un rôle capital à la prolifération de la cellule et au processus de carcinogenèse. La phosphorylation de la protéine ERK conduit à la prolifération incontrôlée de la cellule en bloquant la voie

apoptotique et en activant le cycle cellulaire (124). Le traitement de la cellule tumorale avec la plante SJSZ réduit le niveau de la protéine ERK et active la voie apoptotique. De son côté, la protéine p38 MAPK appartient à la famille de protéine anti-stress qui active les autres protéines via la phosphorylation. Elle joue un rôle crucial dans la survie de la cellule, la prolifération et l'apoptose. La réduction de ces deux enzymes (ERK et p38MAPK) améliore la survie de la cellule qui conduit à la réversion tumorale de la cellule (113).

3.2.3. Immunothérapie

L'organisme humain possède plusieurs types de mécanismes immunitaires nécessaires pour lutter contre les agents infectieux. Parmi les différents mécanismes immunitaires, les interférons (IFN) (tableau 3) et l'interleukine-2 sont les plus utilisés pour le traitement du cancer. Le cancer se développe lorsque le système immunitaire est insuffisant pour reconnaître et pour éliminer les cellules malignes. Ainsi, l'utilisation de certains médicaments peut augmenter et stimuler le système immunitaire. L'abondance de ces derniers détruit les cellules cancéreuses (125).

Tableau 3: Réversion tumorale due à l'utilisation de composants du système immunitaire

Agent sélectif	Gène modifié	Mécanisme d'action
Interféron (α et β)	Ha-ras	Réduction de l'ARNm de l'oncogène Ha-ras

a. L'importance de l'interféron à la réversion tumorale

L'interféron (α et β), utilisé en immunothérapie, est une autre molécule pouvant convertir une cellule maligne en cellule révertante. Au moment où l'interféron est relâché

dans l'organisme, il s'attache directement aux cellules voisines non-infectées et les rend résistantes aux attaques des virus. C'est ainsi qu'un seul type d'interféron peut protéger des infections par différents types de virus (57). L'interféron peut aussi inactiver plusieurs types d'oncogènes y compris c-Ha-ras, N-ras, c-myc, v-mos et v-src. Par exemple, si la fonction de l'oncogène Ha-ras est inhibée dans les cellules RS485 par l'IFN, les cellules deviennent révertantes (clone 4C3) (126) .

b. Mécanisme de la réversion tumorale due aux interférons

Le phénomène de réversion causé par les interférons est associé à la réduction de l'ARNm de l'oncogène Ha-ras. L'incubation de la cellule RS485 en présence de l'interféron entraîne une diminution transitoire de la synthèse de protéine et d'ARN de Ha-ras (126). Le changement de l'expression de l'ARNm encodant Ha-ras dans le clone 4C3 est vérifiable selon la technique de dot blot. Cette diminution de l'expression de l'oncogène peut être due à la dégradation de son ARN pendant ou juste après la transcription. En fait, le phénomène de l'apoptose se réalise durant le processus de la transcription. Un test de vérification montre que l'exposition de la cellule maligne à l'actinomycine D bloque le processus de la transcription. Cette cellule traitée a la même caractéristique que la cellule révertante isolée par l'IFN. En plus, l'exposition de la cellule maligne à la cycloheximide (qui joue un rôle de blocage de la synthèse des protéines) n'a pas d'effet sur l'expression du gène Ha-ras. Par conséquent, ces tests indiquent que le mécanisme de la réversion en présence de l'interféron se déroule durant la transcription.

Quand on retire la solution contenant de l'IFN, la cellule révertante 4C3 ne peut pas survivre indépendamment très longtemps : elle peut seulement maintenir sa stabilité pendant une durée limitée. La suppression de l'IFN entraîne le retour de l'expression de

l'oncogène Ha-ras à son niveau initial et la cellule devient tumorale (126). Le traitement de la cellule tumorale avec l'interféron seul n'est pas suffisant pour obtenir une cellule révertante stable. Si la cellule est exposée à nouveau à l'IFN, elle redevient normale. D'après cette étude, le phénomène de réversion cellulaire est réversible.

L'expérience démontre que la réversion est corrélée à la modification transcriptionnelle causé par l'hyperméthylation de l'ADN. Le mécanisme de la réversion tumorale est dû au contrôle de la méthylation (126). En exploitant le même modèle expérimental de la lignée cellulaire RS485 traitée avec l'IFN (127), deux types de cellules révertantes, à savoir 4C3 et 4C8, ont été isolées. Le test de stabilité démontre que lorsque l'IFN est retiré du milieu de culture, les cellules reprennent un phénotype malin. Ces résultats renforcent l'idée que le phénomène de la réversion cellulaire est réversible. Une série de sous-clones de la cellule révertante 4C3 (PR4, PR5, PR10, PRk) ont aussi des caractéristiques de cellules normales. Par exemple, ces sous-clones ne se développent pas dans l'agar mou et ne provoquent pas des tumeurs chez les souris (128). Comme la cellule 4C3, ces sous-clones sont dépendants de l'interféron. Ces clones et sous-clones sont obtenus suite à la normalisation de la voie transcriptionnelle. L'autre facteur possible qui induit la réversion de ces cellules est l'inhibition de la protéine p21 (protéine activatrice de l'arrêt du cycle cellulaire au cas où la protéine p53 détecte des lésions dans la séquence d'ADN). Le niveau d'expression de la p21 est faible dans la cellule révertante en comparaison aux niveaux d'expression dans la cellule maligne. En absence d'IFN, la quantité de la protéine p21 dans ces cellules s'intensifie. Les cellules révertantes deviennent cancéreuses.

Les cellules révertantes suite au traitement à l'IFN sont résistantes à une nouvelle infection par des virus oncogènes bien que la transfection de ces cellules avec l'oncogène EJ-

ras et le v-mos produit un petit changement (128), d'autres oncogènes (v-ki-ras, v-Ha-ras, v-abl, v-fes) ne peuvent pas transformer cette cellule. En comparant avec la cellule normale NIH3T3, les cellules révertantes sont plus stables aux infections virales parce que la cellule NIH3T3 est très sensible pour devenir cancéreuse lors de la transfection avec ces oncogènes cités ci-dessus (128).

Le processus de la réversion peut être renforcé par une bithérapie d'IFN et d'acide rétinoïque. Par exemple, la réversion de la cellule RS485 suite au traitement avec l'IFN et l'acide rétinoïque est plus stable que la cellule traitée avec l'IFN seul. En particulier, 50 % des cellules sont révertées avec la bithérapie alors que 3% sont révertées avec l'IFN (129). Par contre, le traitement avec l'acide rétinoïque seul n'a pas d'effet; les cellules ne devenant pas révertantes. L'analyse d'ADN indique que la réversion est due à la délétion de l'oncogène Ha-ras lors de l'exposition de la cellule maligne au mélange d'IFN et d'acide rétinoïque pour une durée prolongée. La combinaison de ces deux thérapies améliore le traitement du cancer (129).

3.3. Cellules révertantes dérivées des cellules HeLa et SiHa

Suite à la découverte d'agents sélectifs menant à la réversion du phénotype tumoral, des recherches ont mis l'accent sur le traitement du cancer du col de l'utérus. Certains agents chimiothérapeutiques comme l'EMS et le MNNG et des virothérapies comme le VSV ont montré leur efficacité à supprimer la tumeur du col utérin (121, 130, 131).

Tableau 4. Sélection des cellules révertantes dérivées des cellules HeLa et SiHa lors de leur exposition aux différents agents sélectifs

Agent sélectif	Gène modifié	Mécanisme d'action
EMS	p53 PHTS IGFBP-3	Rehaussement des niveaux de la protéine p53, Expression des nouveaux gènes PHTS et IGFBP-3
MNNG	Inconnu	Mutation génomique
Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV)	Inconnu	Activation de l'interféron
Parvovirus	Inconnu	Contrôle de la transcription et la division cellulaire
Chromosome 6	Chromosome 6	Restauration du chromosome 6 et blocage de l'oncogène E6

3.3.1. La chimiothérapie appliquée à la réversion tumorale des cellules HeLa et SiHa

a. Réversion due à l'utilisation d'EMS

L'EMS joue un rôle important au traitement de la cellule HeLa. Précédemment, on a constaté que le produit chimique EMS a la propriété d'augmenter l'expression du gène

XRCC1 dans la cellule tumorale de EM9 (115). Il a aussi une caractéristique génotoxique qui remplace la paire de base G : C en A : T. Ce produit joue d'autres rôles pour corriger l'agressivité de la cellule HeLa. L'exposition de cette cellule à l'EMS aboutit à l'obtention de deux cellules révertantes HF et HA (131). La prolifération de ces cellules révertantes est vérifiable dans un milieu semi-solide où la morphologie de ces cellules est semblable aux cellules normales : elles sont plates et translucides (131). De plus, ces clones révertants ne croissent pas dans un milieu en suspension et le test de la tumorigénicité *in vivo* montre que ces clones ne peuvent pas conduire à la formation de tumeur chez la souris même après une longue période d'attente (131).

Lors du test de sensibilité, ces clones révertants ont une caractéristique récessive (131). L'hybridation de ces clones révertants avec des clones malins de la cellule HeLa conduit à la formation d'hétérocaryons. Ces cellules hybrides peuvent pousser dans l'agar mou, mais elles sont moins agressives par rapport à la cellule parentale maligne. Alors, si les cellules révertantes sont infectées à nouveau par des virus HPV à haut risque, ces cellules révertantes perdent leur phénotype normal. Donc, ces cellules redeviennent cancéreuses.

Le mécanisme d'action d'EMS pour l'obtention des cellules révertantes dérivées de la cellule HeLa est différent de celui pour la lignée cellulaire EM9. Suite à l'analyse Southern et Northern, on a montré que les génomes des cellules révertantes (HA et HF) ne contiennent pas de réarrangements chromosomiques, ni de diminution d'expression d'oncogène. La réversion cellulaire n'est pas non plus reliée à des changements au niveau des oncoprotéines virales (131). Donc, la réversion ne semble pas être due aux modifications génétiques. Par ailleurs, l'obtention des cellules révertantes HeLa semble être attribuable à l'activation de gènes suppresseurs de tumeur. Suite à l'infection des cellules révertantes par des rétrovirus

défectifs qui contiennent les oncogènes soit E6 et/ou E7 venant du HPV16, des clones différents sont observés. Les clones dérivés de cellules révertantes (HA, HF)/ E7 et de cellules révertantes (HA, HF)/ E6 et E7 ont une morphologie semblable aux cellules révertantes parentales. Ces types de clones gardent leur phénotype normal. De plus, l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 demeure élevée dans ces cellules. Cependant, les clones obtenus à partir de l'infection des cellules révertantes par E7 deviennent cancéreux tel que confirmé par leur capacité de croître en milieu semi-solide (131). Autrement dit, le gène suppresseur de tumeur pRb est inhibé à nouveau. Par conséquent, l'activation d'un seul gène suppresseur de tumeur p53 est une des causes de la réversion tumorale. Alors, le produit EMS peut activer la protéine suppresseur de tumeur p53.

Ce rehaussement de la protéine p53 dans les cellules révertantes est dû à l'enrichissement des protéines p53 du type sauvage (132). Cette protéine est stockée abondamment dans le noyau des cellules révertantes. Le séquençage des exons de l'ADNc encodant p53, notamment la région responsable de la liaison d'E6-Ap confirme l'absence de mutation chez toutes les lignées cellulaires HeLa, HA et HF (132). La protéine E6-Ap reste associée avec la protéine p53 dans les cellules révertantes. Le complexe E6-p53 demeure élevé dans les cellules révertantes. Par contre, le traitement des cellules révertantes avec la cycloheximide entraîne une augmentation de la demi-vie des protéines p53 par rapport à celles de la cellule maligne HeLa. Cette expérience montre que les protéines p53 du type sauvage s'accumulent dans les cellules révertantes.

D'autres protéines suppresseurs de tumeurs (PHTS et IGFBP-3) sont aussi responsables de la normalisation des clones révertantes HA et HF dérivés de la cellule HeLa. Une quantité élevée de ces protéines est détectée dans ces cellules (133, 134). Pour

connaitre si ces gènes jouent un rôle essentiel dans les cellules révertantes, un test de stabilité de p53 a été effectué. L'injection de ces cellules révertantes par un lentivirus qui comporte des vecteurs p53shARN et PsD31-shp53 (ces vecteurs permettent de diminuer les niveaux de la protéine p53) mène à la perte de phénotype normal parce que les cellules s'adaptent au milieu semi-solide et leur morphologie est pareille à celle de la cellule maligne HeLa. Alors, le rétablissement de la protéine p53 sauvage est un facteur de la rémission des cellules, mais cela n'est pas suffisant pour maintenir le phénotype des cellules révertantes. L'expression de plusieurs gènes (IGFBP3, DKK1, GFPR39 et PHTS) est reconstituée dans la cellule révertante HF tel que démontré par l'analyse par micro puce à ADN (133). La protéine PHTS, par exemple, montre une meilleure stabilité que le gène du p53 lors de l'infection par un lentivirus qui contient le vecteur psD31-shPHTS (133). La cellule révertante HF infectée n'est pas très sensible aux infections avec le lentivirus porteur du vecteur psD31-shPHTS (qui inhibe l'expression de la protéine PHTS) parce que l'apparition des rares et faibles colonies est observée dans la culture en agar mou. Pour déterminer le rôle de la protéine PHTS dans le phénomène de réversion tumorale, la cellule maligne HeLa fut traitée par un adénovirus ayant un gène modifié (ad-PHTS) et un vecteur PHTS-GFP dans le but d'augmenter le niveau de la protéine PHTS. Ce virus oncolytique et ce vecteur peuvent arrêter la multiplication de la cellule HeLa avec un taux de suppression de foyer de 70%. Conséquemment, la présence du gène PHTS dans la cellule révertante est une autre cause de la restauration du phénotype normal de cette cellule.

Les gènes IGFBP-3 et Dkk1 sont aussi identifiés comme ayant une responsabilité dans la réversion de la cellule tumorale HeLa suite au traitement à l'EMS. Ces deux gènes sont déjà connus par leur effet inhibiteur dans le cancer de la prostate et du poumon (134). Ces gènes se trouvent aussi dans les cellules révertantes HA et HF et sont exprimés en quantité

non négligeable. Lors d'un test de vérification par la transfection de la cellule HeLa par un vecteur qui comporte l'un de ces gènes, des clones révertants CL4 et CL8 sont isolés grâce à leur incapacité de croître dans l'agar mou. En plus, le clone CL4 ne provoque pas de tumeur dans les souris saines. Alors, l'expression des gènes IGFBP-3 et Dkk1 est une des causes de la rémission de la cellule tumorale HeLa. Par conséquent, l'activation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs (dont p53, PHTS, DKK1 et IGFBP-3) est responsable de la réversion du phénotype cancéreux de la cellule HeLa suite au traitement à l'EMS.

b. Sélection des cellules révertantes avec le MNNG

Le produit chimique MNNG (Figure 3-4) a aussi été utilisé afin d'obtenir une cellule révertante à partir de la cellule HeLa. Le traitement de la cellule HeLa avec le produit MNNG modifie son génome (130) et mène à la réversion de la tumeur. Vingt-neuf mutations causées par le MNNG ont été détectées dans le génome, trois d'entre elles correspondent à des délétions de 62, 100 et 162bp. Il y a aussi des mutations par insertion. La majorité des mutations sont des substitutions affectant les paires de bases GC. À cause de ces changements génétiques, certaines cellules acquièrent leur phénotype normal.

3.3.2. Relation entre la virothérapie et les cellules révertantes dérivées des cellules HeLa et SiHa

a. Obtention des cellules révertantes à l'effet oncolytique du virus VSV

L'utilisation du virus de la somatite vésiculaire oncolytique VSV (*vesicular stomatitis virus*) est un exemple de virothérapie qui montre une efficacité au traitement du cancer du col utérin d'origine VPH (135). Après l'infection des lignées cellulaires malignes par le VSV, les foyers de la cellule HeLa et SiHa sont éliminés rapidement par rapport aux autres types de lignées cellulaires malignes. Entre ces deux lignées cellulaires, la cellule HeLa est plus

sensible au traitement avec les souches AV1 et AV2 du VSV que la cellule SiHa. Le phénomène de la réversion est total pour la cellule HeLa tandis que la cellule SiHa est partiellement restaurée.

Pour ce cas, l'obtention de la réversion est due à la libération des interférons (IFN) (135). En dehors de travaux sur l'inhibition de p53 par l'oncogène viral E6, des recherches confirment que cet oncogène bloque aussi le système immunitaire IFN. Pour découvrir le mécanisme d'action du VSV, un test de virulence est effectué en inoculant les cellules HeLa et SiHa avec ce virus en présence de l'IFN. L'effet cytotoxique de VSV devient faible pour la cellule SiHa traitée par la bithérapie (135). Cependant, la suppression de tumeur demeure inchangée dans le cas des cellules HeLa. Alors, l'activité d'E6 dans la cellule HeLa est totalement bloquée. Par contre, le VSV inhibe partiellement l'oncogène E6 de la cellule SiHa. Le même résultat est obtenu quand on évalue les facteurs de régulation de l'IFN. La cellule SiHa résistante à l'infection de VSV continue de synthétiser des protéines IRF7 et IRF3 qui jouent un rôle important dans la régulation de l'interféron. Ces facteurs ne sont pas détectables dans la cellule HeLa hypersensible. Donc, le pouvoir oncolytique du VSV dépend de la sensibilité à la virulence de la cellule tumorale.

b. Cellules révertantes issues de l'exposition au parvovirus

Des parvovirus naturels et des parvovirus ayant été génétiquement modifiés ont aussi un effet toxique vis-à-vis les cellules tumorales du col utérin. Le traitement de cellules HeLa par le parvovirus H1 et le parvovirus recombinant hH1/IL-2 et MCP-1 modifie l'agressivité de cette lignée cellulaire (121). Tous ces parvovirus oncolytiques peuvent s'introduire et se répliquer dans la cellule HeLa car les protéines virales NS1 et NS2 sont détectables dans cette cellule. Lors de la transplantation des souris saines par les cellules

révertantes dérivées de la cellule HeLa, les souris qui sont infectées par les cellules traitées avec des parvovirus recombinants restent en bonne santé. Par contre, les souris auxquelles on a injecté des cellules traitées avec le parvovirus naturel ont eu des tumeurs, mais ces tumeurs sont moins agressives que celles causées par les cellules HeLa parentales. Conséquemment, les parvovirus recombinants donnent un meilleur traitement que le parvovirus naturel.

Le processus de la lyse cellulaire du parvovirus naturel n'est pas bien détaillé. Cependant, les parvovirus recombinants peuvent bloquer la voie transcriptionnelle et arrêter la division cellulaire incontrôlée (121). Le parvovirus qui contient le vecteur MCP-1 décompose la protéine cellulaire inutile au site N-terminale afin de détruire la cellule maligne. La protéine MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) est une activatrice du phénomène de la phagocytose dans le sang (136). Le parvovirus qui comporte le vecteur IL-2 stimule un des mécanismes du système immunitaire incluant les cellules NK (Natural killer) qui permet à l'organisme de se débarrasser des cellules inutiles. Ces mécanismes immunitaires aident la cellule à tuer les agents infectieux. Dans ce cas, l'addition d'IL-2 et le MCP-1 dans le génome du parvovirus accentue son pouvoir oncolytique(121).

3.3.3. La thérapie impliquée dans la réversion tumorale du cancer du col utérin

Des recherches démontrent aussi que l'immortalisation de la cellule du cancer du col utérin est reliée à la perte du chromosome 6. La restauration de ce chromosome via la transfection rétablit le phénotype cellulaire normal (137). En effet, la transfection de la lignée cellulaire maligne FK16 par les chromosomes 6 ou 11 entraîne une apparition de plusieurs clones, incluant les clones FK16/Hyg6 et FK16/Hyg11. D'ailleurs, 49 % des clones

FK16/Hyg6 montrent une inhibition de la prolifération de la cellule. Parmi les clones FK16/Hyg6, 92% sont des clones révertants tandis que seulement un sur sept exhibe une caractéristique semblable à la cellule normale pour le FK16/Hyg11. On conclut alors que le chromosome 6 joue un rôle primordial dans la correction de la cellule maligne.

Des tests de l'enzyme télomérase (qui permet à la cellule de préserver la longueur de ses chromosomes) ont été effectués pour justifier l'importance du chromosome 6. Autrement dit, si le taux de cet enzyme augmente dans la cellule, le chromosome 6 reste inhibé et la cellule demeure en état cancéreux car la surexpression de la télomérase a un effet anti-apoptotique (137). En fait, la plupart des clones FK16/Hyg6 contiennent un taux d'enzyme télomérase très bas. Par contre, la quantité de cet enzyme dans les clones FK16/Hyg11 reste constante. Par conséquent, l'obtention des cellules révertantes est reliée à la diminution de l'activité de l'enzyme télomérase.

Une autre méthode pouvant être utilisée afin de déterminer l'importance de l'enzyme télomérase dans le phénomène de réversion est l'introduction du gène hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), (138), à l'aide d'un vecteur LZRS-hTERT-IRES-GFP ou du contrôle LZRS-linker-IRES-GFP dans ces clones FK16/Hyg6 (137). Un affaiblissement de l'activité de l'enzyme télomérase et une restriction de la multiplication cellulaire sont observés dans les clones infectés par les vecteurs sans hTERT. Par contre, le taux de l'enzyme télomérase augmente dans les clones transfectés par le vecteur qui contient le gène hTERT et la prolifération des clones devient alors incontrôlée. En effet, la quantité de l'enzyme télomérase influence l'apparition des clones révertants. La diminution de cet enzyme qui est due à l'insertion du chromosome 6 est donc très importante pour la réversion tumorale.

La cellule SiHa est aussi traitable par l'incorporation du chromosome 6 dans son ADN (137). Des clones révertants ont été sélectionnés lors de la transfection de cette cellule par le chromosome 6. Le résultat du test de l'activité de l'enzyme télomérase des clones SiHa/Hyg6 est comparable à celui de FK16/Hyg6. Alors, le chromosome 6 joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération de la cellule du col utérin.

DISCUSSION

Au cours des dernières décennies, plusieurs thérapies anticancéreuses ont été développées (111, 139). Les premiers traitements sont en général découverts par hasard par l'utilisation des vaccins et des plantes médicinales. Le but de notre étude pour l'emploi de différentes thérapies est d'avoir un effet cytolytique puissant pour modifier le comportement de la cellule tumorale. Plusieurs types de thérapies ont cette capacité; ils sont classés en 3 grandes catégories: les virothérapies, les chimiothérapies et les immunothérapies.

a. Les avantages et les inconvénients des virothérapies

Les virothérapies sont divisées en deux sous-groupes, selon le type de virus utilisé : les virus oncolytiques naturels et les virus comportant des gènes modifiés. Le traitement avec les virus oncolytiques représente beaucoup d'avantages, mais leur pouvoir cytolytique est limité. Prenons le cas du parvovirus comme exemple. Ce virus peut pénétrer les cellules malignes et tuer plusieurs types de cancer. Il est plus efficace envers le cancer du cerveau, le neuroblastome, le mélanome et le cancer gastro-intestinal. Cependant, les cellules révertantes obtenues par l'exposition du cancer du côlon et de l'hémangiosarcome avec ce virus ne sont pas stables. La complexité de récepteur du parvovirus dans les cellules

malignes permet d'expliquer ce problème. Dans le cas de certains cancers, la présence de l'acide sialique dans la membrane de la cellule hôte facilite l'attachement du parvovirus (140). Par contre, les cellules dépourvues d'acide sialique n'ont pas été traitées au parvovirus parce que la fonction de cet acide neutralise l'enzyme neuraminidase qui empêche le parvovirus de se lier à la membrane de la cellule hôte. D'autres phénomènes peuvent être à l'origine de cette différence, mais ils restent obscurs jusqu'ici.

Pour le cas du virus de l'herpès, le HSV1 de type sauvage est pathogène pour l'être humain. Il peut causer une maladie appelée encéphalite qui se localise dans le cerveau (141). C'est-à-dire que ce virus a une caractéristique neurotrophique. De même que ce virus est virulent pour l'être humain, il possède aussi une propriété oncolytique. Cependant, les HSV1 atténués ne sont pas agressifs envers les cellules normales. Ensuite, à cause de leur caractéristique neurotrophique, les cancers de cerveau et neuroblastomes sont des cibles avantageuses de cette thérapie. Par contre, le HSV1 peut aussi être utilisé afin de traiter d'autres types de cancer comme le mélanome, le cancer du côlon, du sein, poumon, de la prostate et ainsi que l'hépatite avec un effet cytotoxique limité (142). À cause du pouvoir oncolytique relativement faible du HSV1, les chercheurs ont trouvé d'autres moyens pour améliorer ce traitement comme l'assemblage de HSV1790 avec le CB1954. Cette bithérapie donne un meilleur résultat parce que l'effet toxique du CB1954 complète le HSV1790. Alors l'utilisation de la bithérapie est certainement bénéfique pour le traitement du cancer.

De même que le pouvoir oncolytique du HSV1 est faible pour certains cancers, il montre plus d'avantages que l'adénovirus. L'adénovirus n'est pas capable de se répliquer dans plusieurs types de cancers (gastrointestinal, pancréas, ovarien et prostate). Ce problème est attribuable à l'absence du récepteur viral dans ces cancers (143). Alors ce virus

n'est pas recommandé pour traiter ces types de cancer. Par contre, l'adénovirus est très important au remplacement des gènes suppresseurs de tumeurs. La modification du génome adénoviral par l'ajout des gènes suppresseurs de tumeurs comme le DLC1 et TSCL1 représente une approche thérapeutique très efficace pour les cancers ayant un ou plusieurs gènes bloqués. Le défi avec ce traitement est que les produits de certains gènes requièrent des sites spécifiques qui leur permettent de s'attacher à la membrane de la cellule hôte. Prenons le cas du DLC1, qui exige la présence de la protéine alpha-caténine pour qu'il puisse se lier à la cellule. L'absence de cette protéine rend la thérapie inefficace.

À l'inverse, le réovirus est capable de détruire plusieurs types de cancers (144). Son efficacité est due à l'abondance de cathepsines (protéases du lysosome) et de la protéine Ras qui facilitent la décapsidation virale. En plus, la protéine Ras est une protéine multifonctionnelle. Elle favorise la traduction des protéines virales et aide à l'assemblage des particules virales (144). Pour cette raison, les cellules cancéreuses sont sensibles à l'infection par réovirus.

b. La similarité et la différence entre le virothérapie et chimiothérapie

Toutes ces thérapies ont une valeur spécifique importante au traitement du cancer. La virothérapie et la chimiothérapie partagent quelques similarités quant à leur mécanisme d'induction de la réversion tumorale. Toutes les deux peuvent activer la voie apoptotique mais le processus sous-jacent est différent. (73, 79, 86, 112, 120, 145). Pour le cas de la virothérapie, l'induction de l'apoptose est due à la réduction de la protéine TCTP. Par contre, dans le cas de la chimiothérapie, l'apoptose se réalise lors de l'inhibition de la division cellulaire ou à la restauration de l'histone acétylase qui est un co-activateur de la protéine

p53. Ensuite, ces deux thérapies comportent aussi des caractéristiques particulières. La virothérapie active plusieurs types de protéines suppresseurs de tumeur lors de la modification du génome viral (97;102). Par contre, la chimiothérapie a des conséquences plus larges. Elle peut activer les gènes responsables de la réparation de la cassure d'ADN. Elle peut aussi contrôler l'enzyme qui synthétise les molécules de base d'ADN. Elle peut activer les mécanismes du système immunitaire comme les interférons (113).

c. Effets secondaires de la chimiothérapie

Même si la chimiothérapie représente une approche d'intérêt du traitement du cancer, elle peut causer des effets nocifs très graves en comparaison avec la virothérapie. En général, la virothérapie n'induit pas des effets indésirables (73) et elle provoque des effets tolérables (exemple virus de la rougeole atténué) à notre organisme (110). Par contre, l'utilisation de la chimiothérapie a des impacts graves sur la santé (146). Prenons l'exemple d'une femme qui a subi un traitement du cancer de sein avec la chimiothérapie. Trois ans plus tard, elle a eu un cancer de l'os et du foie. À cause de la sélection de cellules tumorales résistantes au traitement, des mutations peuvent être produites. Ensuite, le traitement avec la chimiothérapie peut accélérer aussi la ménopause pour les femmes (147). Ce problème se produira lors du dommage dans les ovaires. La ménopause précoce a des effets sur la santé physique et psychiques. Elle peut entraîner la perte des minéraux dans les os et augmenter le risque d'avoir un problème cardiaque. Elle peut causer aussi des malaises comme la nausée et le vomissement (148). Certains patients perdent aussi leurs cheveux à cause de la chimiothérapie (149). Alors, l'utilisation des chimiothérapies doit donc être faite avec précaution.

d. L'importance de la chimiothérapie à la cellule révertante du col utérin

En regardant les côtés positifs de la chimiothérapie, nous pouvons dire que les recherches en matière de chimiothérapie ont permis d'explorer des nouvelles perspectives de traitement de maladies redoutables comme le cancer du col utérin. En plus, leur efficacité nous permet de découvrir la clé de la réversion tumorale. Parmi les thérapies utilisées, la chimiothérapie représente le meilleur traitement pour le cancer du col utérin. À cause de son caractère multifonctionnel, cette thérapie conduit à la stabilité des cellules révertantes à partir de l'activation de plusieurs gènes suppresseur de tumeur (p53, pHTS, IGFBP-3, DKK-1) (131; 134) et la modification de l'ADN génomique qui contribue à l'obtention de la cellule révertante (130). Par comparaison, le pouvoir cytolytique de la virothérapie envers le cancer du col utérin est limité (135). L'efficacité de cette thérapie dépend de l'agressivité du cancer. Avec un même traitement, la cellule HeLa reçoit un meilleur traitement avec le VSV que la cellule SiHa plus agressive. En plus, le parvovirus qui soigne bien les cancers du cerveau et les neuroblastomes est faiblement oncolytique envers le cancer du col utérin.

e. Les perspectives d'avenir des cellules révertantes dérivées des cellules HeLa et

SiHa

L'avantage de la chimiothérapie est non seulement d'activer certains gènes suppresseurs de tumeur, mais aussi d'augmenter la chance de découvrir des nouvelles thérapies. Lors du traitement de la cellule HeLa avec l'EMS, des gènes suppresseurs de tumeurs (IGFBP3 et PHTS) furent identifiés comme étant responsables de l'apparition des clones révertants (133 ; 134). Le test de vérification de ces gènes à l'aide de l'injection de la cellule HeLa par l'ad-PHTS et ad-IGFBP3 donne aussi un meilleur traitement contre cette cellule maligne. Ce dernier est un autre type de thérapie. Alors, la découverte de ces deux gènes amène à la création de nouvelles virothérapies. En se basant sur ces thérapies, ce

traitement est-il efficace si on l'applique au cancer plus agressif que la cellule HeLa? Dans la majorité des cas, les études sont effectuées avec la cellule HeLa. Rares sont les expériences qui utilisent les deux à la fois. En plus, les études avec la cellule SiHa ne conduisent généralement pas à un bon résultat en comparaison à celles utilisant les cellules HeLa. Cependant, les deux lignées cellulaires ont partagé une propriété similaire à cause de la présence des oncogènes E6 et E7. Le traitement de la cellule SiHa avec l'EMS et les deux virus modifiés (ad-IGFBP3 et ad-PHTS) serait intéressant à effectuer. On pourrait également traiter les deux lignées cellulaires malignes (HeLa et SiHa) avec les virus qui contiennent deux gènes modifiés comme ad-IGFBP3-p53, ad-IGFBP3-PHTS et ad-PHTS-p53.

Ensuite, d'après le mécanisme d'action, le rehaussement de niveaux de certaines protéines est un des facteurs qui normalise la cellule HeLa. Certains virus sont considérés comme étant plus efficace contre cette cellule à cause de leurs propriétés qui peuvent stabiliser la quantité de certaines protéines dans la cellule tumorale. Parmi eux, le virus oncolytique ONYX-015 a une préférence de se répliquer dans les cellules malignes dont le gène p53 est muté (150). Ce virus est un adénovirus qui contient un gène encodant une version modifiée de la protéine E₁ B. Cette modification favorise l'attachement de ce virus aux protéines p53 mutées. Ce virus a conduit à un bon résultat lors de son utilisation dans le traitement de différents types de cancers (cancer du foie, du canal biliaire et de la vésicule biliaire) ayant un taux de p53 mutées très élevé. Son efficacité est vérifiable en clinique où 50% des patients traités par ce virus ont été guéris (151). La guérison de ces patients correspond à la restauration de p53 dans leur tumeur. Ces virus ont comme caractéristique d'enrichir les protéines p53 sauvage dans les cellules tumorales. Cela pourrait être un meilleur traitement pour la cellule HeLa et SiHa et les cellules du cancer du col utérin.

Un autre type de virus (ad Δ 24-p53) démontre des propriétés prometteuses dans le traitement du cancer cervical. L'ad Δ 24-p53 est un adénovirus atténué qui est caractérisé par la suppression de huit acides aminés dans une section de la protéine E1B qui est responsable de la liaison à la protéine pRB (152). Ce virus montre une bonne efficacité dans le traitement de cancers dont les protéines p53 sont bloquées (152). En plus, ce virus est connu pour sa capacité d'intensifier les niveaux de p53 sauvage dans les cellules malignes. En comparant avec l'adwt-p53 (adénovirus exprimant le p53 sauvage : ad-p53), l'ad Δ 24-p53 est plus efficace contre les cellules cancéreuses que l'ad-p53. On reconnaît que l'un des problèmes des cellules HeLa et SiHa est l'absence des protéines p53 libre et fonctionnelle. D'après ce que nous avons cité précédemment, le rétablissement des protéines p53 peut aider ces cellules malignes de quitter leur état malin. Le traitement de ces cellules avec l'ad Δ 24-p53 pourra mener à l'obtention de cellules révertantes plus stables que l'ad-p53. À partir de cette nouvelle thérapie, on pourra également découvrir l'effet de l'ad Δ 24-PHTS, l'ad Δ 24-IGFBP3, l'ad Δ 24-p53-PHTS, l'ad Δ 24-p53-IGFBP3, l'ad Δ 24-PHTS-IGFBP3 et l'ad Δ 24-p53-PHTS-IGFBP3 dans les deux cellules HeLa et SiHa.

Des produits chimiques peuvent être utiles au traitement du cancer du col utérin à cause de leur capacité d'activer la protéine p53. La nutline-3 est un produit chimique dont l'efficacité a été démontrée en égard au traitement du cancer de la prostate (153). Le cancer de la prostate se produira lors de la fixation de l'oncoprotéine MDM2 à la protéine p53 bloquant la fonction de cette dernière. L'exposition de cellules tumorales de prostate à la nutline-3 dissocie cette liaison et les p53 libérées peuvent reprendre leur rôle. Alors, si la nutline-3 peut couper la liaison MDM2-p53, il peut être intéressant de la tester chez les cellules HeLa et SiHa. L'idée générale est que la nutline-3 pourrait perturber l'interaction entre E6 et p53, restaurant l'activité de ce dernier. Cependant l'effet de la nutline-3 sur

l'association d'E6 avec p53 n'est pas garanti parce que le mécanisme d'action de nutline-3 avec le MDM2 demeure inconnu.

D'autres produits chimiques comme la fluoropyrimidine 5-fluororacile (5-FU), des inhibiteurs de la topoisomérase I (irinotécan, l'oxaliplatine et le tomudex®) peuvent activer le p53 via l'enrichissement des niveaux cellulaires du récepteur Fas (154). Ce récepteur est classé dans la famille des protéines du facteur de nécrose tumoral et peut stimuler la voie apoptotique. L'utilité de ces produits chimiques est validée lors du traitement de la cellule cancéreuse colorectale. Parmi ces médicaments, on souligne l'importance du CPT-11 et oxaliplatine qui augmentent abondamment la quantité de récepteur Fas. Cependant, cet effet est plus limité lors du traitement au 5-FU et au tomudex®. Par contre, la bithérapie CPT-11 ou oxaliplatine avec 5-FU intensifie la qualité du traitement du cancer. À cause du potentiel de ces médicaments à restaurer la fonction de p53, ils sont probablement intéressants au traitement de la cellule HeLa et SiHa.

CONCLUSION

L'étude du processus de la réversion tumorale nous a permis de proposer de nouvelles pistes de thérapies du cancer. Le cancer cervical est connu comme l'une des maladies gynécologiques les plus importantes au monde. Certaines thérapies sont déjà élaborées pour combattre cette maladie. Parmi ces thérapies, la chimiothérapie EMS représente un meilleur traitement de ce cancer. L'utilisation du produit chimique MNNG est aussi une autre façon de contrôler la multiplication cellulaire de la cellule HeLa. Le retour au phénotype atténué est attribuable aux modifications génétiques. Cependant, la réversion cellulaire n'est pas un phénomène parfait. La pratique des virothérapies est recommandée pour le traitement du cancer cervical, mais leur effet oncolytique est limité. La cellule HeLa est plus sensible à cette stratégie que la cellule SiHa. Le pouvoir cytotoxique de ces virus dépend de l'agressivité du cancer. L'incorporation de virus avec des cytokines représente beaucoup d'avantage aux thérapies cancéreuses que l'utilisation de virus seul. L'exploration des éléments manquants tel que la protéine supresseur de tumeur p53 et l'introduction du chromosome 6 dans la cellule sont d'autres voies qui devraient être explorées. La transfection de la cellule maligne du col utérin par le chromosome 6 empêche la reproduction anormale de cette cellule. En fait, en utilisant plusieurs de ces thérapies pour isoler quelques clones révertants au sein de plusieurs cellules malignes, nous avons fini par la découverte de la réversion tumorale dérivée de la cellule HeLa et SiHa. Dans cette étude, nous démontrons que la réversion tumorale est une méthode efficace permettant aux cellules tumorales de quitter leur état malin via l'activation de certaines protéines suppresseurs de tumeurs et l'induction de la voie apoptotique. L'étude de la réversion tumorale nous a permis d'identifier certaines protéines (p53, PHTS, IGFBP3) clés

responsables de ce processus biologique. La compréhension de ce mécanisme de la réversion tumorale nous conduit à la découverte de plusieurs autres thérapies (ad-p53, ad-IGFBP3, ad-PHTS, ad Δ 24-p53, ad Δ 24-IGFBP3, ad Δ 24-PHTS, erts, ONYX-015, nutline-3, irinotécan, oxaliplatine et tumodex®) importantes à la nouvelle direction de notre recherche sur le traitement du cancer du col utérin.

REFERENCES

1. Pommier Y, Kohn KW. Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: Nouvelles cibles thérapeutiques. *M/S*, 2003;19(2).
2. Robert J. Les voies de contrôle du cycle cellulaire. In: *Signalisation cellulaire et cancer*. Springer; 2010. p. 199-213.
3. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med*. 1999;5(10):1164-70.
4. Brait M, Ling S, Nagpal JK, Chang X, Park HL, Lee J, et al. Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers. *PloS ONE*. 2012;7(9):e44951.
5. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: Novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*. 2009;19(2):97-113.
6. Korzeniewski N, Duensing S. Disruption of centrosome duplication control and induction of mitotic instability by the high-risk human papillomavirus oncoproteins E6 and E7. In: *The Centrosome*. Springer; 2012. p. 201-21.
7. Stoppa-Lyonnet D, Stern M, Soufir N, Lenoir G. Prédispositions génétiques aux cancers: Actualités et perspectives en 2010. *Patho. Biol*. 2010;58(5):324-30.
8. Andrieu J, Colonna P, Lévy R. *Cancers: Guide pratique d'évaluation, de traitement et de surveillance*. Estem; 1997.

9. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Supérieur; 2005.
10. Pascal LE, Ai J, Vêncio RZ, Vêncio EF, Zhou Y, Page LS, et al. Differential inductive signaling of CD90 prostate cancer-associated fibroblasts compared to normal tissue stromal mesenchyme cells. *Cancer Microenviron*. 2011;4(1):51-9.
11. Ginestier C, Korkaya H, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS, Charafe-Jauffret E. La cellule souche cancéreuse. *M/S (Paris)*. 2007;23:1133-40.
12. Karp G. Biologie cellulaire et moléculaire. De Boeck Université; 2004.
13. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. ADN recombinant. De Boeck Université; 1994.
14. Lewin B, Sanlaville C. Gènes VI. Paris: De Boeck Université; 1999.
15. Yarbrow C, Wujcik D, Barbara H. Cancer nursing: Principles and practice: Principles and practice. Jones & Bartlett Learning; 2010.
16. Monsonego J. Papillomavirus et cancer du col de l'utérus *M /S*. 1996;12:733-44.
17. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiologie. 2e éd française ed. Bruxelles: De Boeck; 2003.
18. Morice P, Castaigne D. Cancer du col utérin. Paris: Masson; 2005.
19. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010;40(1):1-13.
20. Weinberg RA. The biology of cancer. New York, NY: Garland Science; 2007.

21. Zeng M, Kikuchi H, Pino MS, Chung DC. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. *PLoS ONE*. 2010;5(6):e10966.
22. Figlioli G, Landi S, Romei C, Elisei R, Gemignani F. Medullary thyroid carcinoma (MTC) and proto-oncogene: Mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. *Mutation Research/Reviews in Mutation Res*. 2012.
23. Speicher MR, Howe C, Crotty P, du Manoir S, Costa J, Ward DC. Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res*. 1995;55(5):1010-3.
24. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS*. 2010; 277(2):301-8.
25. Nussenzweig A, Nussenzweig MC. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell*. 2010;141(1):27-38.
26. Thompson SL, Compton DA. Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res*. 2011;19(3):433-44.
27. Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and gag during assembly of individual viral particles. *Proceeding of the National Academy of the Science of the U.S.A*. 2009; 106(45):19114-9.
28. Campitelli M, Jeannot E, Peter M, Lappartient E, Saada S, de la Rochefordière A, et al. Human papillomavirus mutational insertion: Specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients. *PloS ONE*. 2012; 7(8):e43393.
29. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes & cancer*. 2011;2(4):466-74.

30. Sage J, Attardi L, Van Dyke T. Roles of p53 and pRb tumor suppressor networks in human cancer: Insight from studies in the engineered mouse. In: Genetically Engineered Mice for Cancer Res. Springer; 2012. p. 293-308.
31. Soussi T. Cycle cellulaire et apoptose: Le gène suppresseur de tumeur p53. M/S. 2000; 16 (4): 469-72.
32. Mougin C, Bourgault-Villada I, Coursaget P. Vaccination anti-HPV pour la prévention du cancer du col de l'utérus. Presse Med. 2009;38(12):1750-68.
33. Kamina P. Précis d'anatomie clinique. Paris: Maloine; 2002.
34. Crouch JE. Functional human anatomy. 4th ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1985.
35. Camus É, Heim N, Nisand I, Camus É. Gynécologie, obstétrique :Soins infirmiers. 4e éd. Paris: Masson; 2006.
36. Ramani S, Sankaranarayanan R. Guide pratique pour le dépistage visuel des néoplasies cervicales. Iarc; 2004.
37. de Villiers E, Fauquet C, Broker TR, Bernard H, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004;324(1):17-27.
38. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoi E, Danassi-Afentaki D, et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. Mod. Pathol. 2000; 13(6):644-53.
39. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. EMBO J. 2002;21(18):4754-62.
40. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. Virol J. 2011;8:269.

41. Ramírez-Salazar E, Centeno F, Nieto K, Valencia-Hernández A, Salcedo M, Garrido E. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology J*. 2011;8(1):1-10.
42. Ding Q, Li L, Whyte P. Human papillomavirus 18 E1E4 protein interacts with cyclin A/CDK 2 through an RXL motif. *Mol Cell Biochem*. 2013;373(1-2):29-40.
43. Gao P, Zheng J. High-risk HPV E5-induced cell fusion: A critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *J Virol*. 2010;7:238.
44. Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Müller M, Howell G, Harris M, et al. High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J Virol*. 2012;86(9):5341-51.
45. Fertey J, Hurst J, Straub E, Schenker A, Iftner T, Stubenrauch F. Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8E2C proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein. *J Virol*. 2011;85(6):2918-26.
46. Bienkowska-Haba M, Williams C, Kim SM, Garcea RL, Sapp M. Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *J Virol*. 2012;86(18):9875-87.
47. Mamoor S, Onder Z, Karanam B, Kwak K, Bordeaux J, Crosby L, et al. The high risk HPV16 L2 minor capsid protein has multiple transport signals that mediate its nucleocytoplasmic traffic. *Virology*. 2012;422(2):413-24.
48. Monsonégo J. Emerging issues on HPV infections: From science to practice. S Karger Ag; 2006.
49. Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, DeSalle R, et al. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS ONE*. 2011;6(6):e21375.

50. Mougin C, Nicolier M, Decrion-Barthod A. HPV et cancers: Mécanismes de l'oncogenèse. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008; (405):35-42.
51. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathology*. 2012;6(1):3-15.
52. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics*. 2009;12(5-6):268-80.
53. Moody CA, Laimins LA. The life cycle of human papillomaviruses. In: *DNA Tumor Viruses*. Springer; 2009. p. 75-104.
54. Monson J. *Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus*. Springer; 2007.
55. Wang X, Meyers C, Wang H, Chow LT, Zheng Z. Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J Virol*. 2011;85(16):8080-92.
56. Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: Lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett*. 2011;305(2):113-22.
57. Acheson NH. *Fundamentals of molecular virology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2007.
58. Sellors JW, Sankaranarayanan R. *Colposcopie et traitement des néoplasies cervicales intraépithéliales*. Iarc; 2004.
59. Nam K, Kwak J, Kim J, Jeon S. Human papillomavirus type 16 causes larger colposcopic lesions than other HPV types in patients with grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *J. low. Gal tract. Dis*. 2013;17 (1):1-5.

60. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: Critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(5):315-24.
61. Ly A. Le cancer du col utérin: Nouveaux vaccins, nouvelles perspectives? *Journal africain du cancer/African Journal of Cancer.* 2009;1(2):65-7.
62. Hasiniatsy N, Rabarijaona L, Rafaramino F. Évolution des aspects épidémiologiques du cancer du col utérin dans le service oncologie d'Antananarivo, Madagascar. *Journal Africain du Cancer/African Journal of Cancer.* 2011;3(1):3-7.
63. Raharisolo Vololonantenaina C, Rabarijaona L, Rajemiarimoelisoa C, Rasendramino M, Migliani R. Bilan des cancers du sein diagnostiqués à l'Institut Pasteur de Madagascar de 1995 à 2001. *Arch Inst Pasteur de Madagascar.* 2002;68(1&2):104-8.
64. Gargano JW, Nisenbaum R, Lee DR, Ruffin IV MT, Steinau M, Horowitz IR, et al. Age-group differences in human papillomavirus types and cofactors for cervical intraepithelial neoplasia 3 among women referred to colposcopy. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2012;21(1):111-21.
65. Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical disease: A review. *Austr. and J. Obst. and Gynecol.* 2011;51(2):103-8.
66. Syrjanen KJ. Histology, classification and natural history of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *cancer Res.* 2009;14:4-21.
67. Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, Kyrgiou M, Tsoumpou I, Valari O, et al. Alterations in human papillomavirus-related biomarkers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2011;121(1):43-8.

68. Hazewinkel M, Sprangers M, Van der Velden J, Van der Vaart C, Stalpers L, Burger M, et al. Long-term cervical cancer survivors suffer from pelvic floor symptoms: A cross-sectional matched cohort study. *Gynecol Oncol*. 2010;117(2):281-6.
69. Beauchemin N, Huot J, SpringerLink. Metastasis of colorectal cancer. Dordrecht ;New York: Springer; 2010.
70. Ma B, Xu Y, Hung C, Wu T. HPV and therapeutic vaccines: Where are we in 2010? *Current cancer therapy reviews*. 2010;6(2):81-103.
71. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix™ and Gardasil® human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. *Human vaccines*. 2009;5(10):705-19.
72. Deschuyteneer M, Miseur A. Structural characterization of L1 virus-like particles used as antigens in Cervarix™, the HPV-16 and HPV-18 vaccine against cervical cancer. *Microsc. and Microanaly.* 2010;16(S2):1060-1.
73. Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Géant A, Beaucourt S, et al. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15364-9.
74. Cann SAH, Gunn HD, van Netten JP, van Netten C. Spontaneous regression of pancreatic cancer. *Case Reports and Clinical Practice Review*. 2004:293-6.
75. Verderame MF, Kohtz DS, Pollack RE. 94,000-and 100,000-molecular-weight simian virus 40 T-antigens are associated with the nuclear matrix in transformed and revertant mouse cells. *J Virol*. 1983;46(2):575-83.

76. Wollmann G, Ozduman K, van den Pol, Anthony N. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: Concepts and candidates. *Cancer J.* 2012;18(1):69.
77. Vile R, Ando D, Kirn D. The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer: Unique biological and biosafety points to consider. *Cancer Gene Ther.* 2002;9(12):1062-7.
78. Rommelaere J, Cornelis J, Dinsart C, Schlehofer JR, Geletneky K, Calle MHY. Use of parvovirus for brain tumor therapy. *Cancer Res.* 2007: 1-8
79. Lacroix J, Leuchs B, Li J, Hristov G, Deubzer HE, Kulozik AE, et al. Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells. *Int. J. of Cancer.* 2010;127(5):1230-9.
80. Giese NA, Raykov Z, DeMartino L, Vecchi A, Sozzani S, Dinsart C, et al. Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther.* 2002;9(5):432-42.
81. Yoon SS, Nakamura H, Carroll NM, Bode BP, Chiocca EA, Tanabe KK. An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma. *FASEB J.* 2000 ;14(2):301-11.
82. Braidwood L., Dunn PD., Hardy S., Evans TJ., Brown SM. Antitumor activity of a selectively replication competent herpes simplex virus (HSV) with enzyme prodrug therapy. *Anticancer Res.* 2009; 29(6):2159-66.
83. Mao X, Seidlitz E, Truant R, Hitt M, Ghosh HP. Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene.* 2004;23(33):5632-42.

84. Shmulevitz M, Gujar SA, Ahn D, Mohamed A, Lee PW. Reovirus variants with mutations in genome segments S1 and L2 exhibit enhanced virion infectivity and superior oncolysis. *J Virol*. 2012;86(13):7403-13.
85. Zhang S, Cai W, Zhang Y, Jiang K, Zhang K, Wang W. Engineered measles virus edmonston strain used as a novel oncolytic viral system against human neuroblastoma through a CD46 and nectin 4-independent pathway. *Cancer Lett*. 2012; 325(2): 227-33.
86. Moehler MH, Zeidler M, Wilsberg V, Cornelis JJ, Woelfel T, Rommelaere J, et al. Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther*. 2005;16(8):996-1005.
87. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286(3):433-42.
88. Dudeja V, Mujumdar N, Phillips P, Chugh R, Borja-Cacho D, Dawra RK, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1772-82.
89. Homa FL, Brown JC. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol*. 1998;7(2):107-22.
90. Hummel JL, Safroneeva E, Mossman KL. The role of ICP0-null HSV-1 and interferon signaling defects in the effective treatment of breast adenocarcinoma. *Mol Ther*. 2005 ;12(6):1101-10.
91. Liu B, Robinson M, Han Z, Branston R, English C, Reay P, et al. ICP34. 5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther*. 2003;10(4):292-303.

92. Han H, Amidon GL. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS PharmSci*. 2000;2(1):48-58.
93. Christofferson A, Wilkie J. Mechanism of CB1954 reduction by *Escherichia coli* nitroreductase. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(2):413.
94. Heise C, Kirn DH. Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J Clin Invest*. 2000;105(7):847-52.
95. Chahal J, S., Flint SJ. The p53 protein does not facilitate adenovirus type 5 replication in normal human cells. *J. Virol*. 2013;87(10):6044.
96. Guan M, Tripathi V, Zhou X, Popescu N. Adenovirus-mediated restoration of expression of the tumor suppressor gene DLC1 inhibits the proliferation and tumorigenicity of aggressive, androgen-independent human prostate cancer cell lines: Prospects for gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 2008;15(6):371-81.
97. Schwab M, SpringerLink, Springer. *Encyclopedia of cancer*. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012.
98. Yuan B, Durkin ME, Popescu NC. Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;140(2):113-7.
99. Guan M, Zhou X, Soultzis N, Spandidos DA, Popescu NC. Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: Potential clinical applications. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1412-9.
100. Yuan B, Zhou X, Durkin ME, Zimonjic DB, Gumundsdottir K, Eyfjord JE, et al. DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity. *Oncogene*. 2003;22(3):445-50.

101. Tripathi V, Popescu NC, Zimonjic DB. DLC1 interaction with α -catenin stabilizes adherens junctions and enhances DLC1 antioncogenic activity. *Mol Cell Biol.* 2012;32(11):2145-59.
102. Lu B, Di W, Wang H, Ma H, Li J, Zhang Q. Tumor suppressor TSLC1 is implicated in cell proliferation, invasion and apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by regulating akt signaling pathway. *Tumor Biol.* 2012;33(6):2007-17.
103. Liang Q, Chen G, Li Z, Wang B. Function and histopathology of a cell adhesion molecule TSLC1 in cancer. *Cancer Invest.* 2011;29(2):107-12.
104. Cotmorel SF, Tattersall P. Parvovirus DNA replication. 1996: 799-811.
105. Lu B, Di W, Wang H, Ma H, Li J, Zhang Q. Tumor suppressor TSLC1 is implicated in cell proliferation, invasion and apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by regulating akt signaling pathway. *Tumour Biol.* 2012; 33(6):2007-17.
106. Hirasawa K, Nishikawa SG, Norman KL, Alain T, Kossakowska A, Lee PW. Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. *Cancer Res.* 2002;62(6):1696-701.
107. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating ras and its relatives. *Nature.* 1993;366(6456):643-54.
108. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & Cancer.* 2011;2(3):344-58.
109. Etoh T, Himeno Y, Matsumoto T, Aramaki M, Kawano K, Nishizono A, et al. Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus. *Clinic. Cancer Res.* 2003;9(3):1218-23.

110. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng K. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2004;64(14):4919-26.
111. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008;68(21):8643-53.
112. Liang W, Kujawski M, Wu J, Lu J, Herrmann A, Loera S, et al. Antitumor activity of targeting SRC kinases in endothelial and myeloid cell compartments of the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research.* 2010;16(3):924-35.
113. Lee J, Lim KT. Modulatory effect of phytylglycoprotein (38kDa) on cyclin D1/CDK4 in BNL CL.2 cells induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2012; 385(2):181-90.
114. Duell EJ, Wiencke JK, Cheng T, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TDS, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis.* 2000; 21 (5):965-71.
115. Barrows LR, Paxton MB, Kennedy KA, Thompson LH. Characterization of revertants of the CHO EM9 mutant arising during DNA transfection. *Carcinogenesis.* 1991; 12(5):805-11.
116. Urlaub G, Chasin LA. Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 ; 77(7):4216-20.
117. Schnell JR, Dyson HJ, Wright PE. Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2004;33:119-40.
118. Huang R, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng Z, Boynton AL. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res.* 1998;58(22):5089-96.

119. Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(21):12725-31.
120. Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2000;60(18):5165-70.
121. Haag A, Menten P, Damme JV, Dinsart C, Rommelaere J, Cornelis JJ. Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther.* 2000;11(4):597-609.
122. Legube G, Linares LK, Tyteca S, Caron C, Scheffner M, Chevillard-Briet M, et al. Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J Biol Chem.* 2004;279(43):44825-33.
123. Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C. Role of caspases, bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem.* 2003;278(14):12579-89.
124. Duan S, Cheng L, Li D, Zhu J, Xiong Y, Li X, et al. The role of MAPK-ERK pathway in 67-kDa laminin receptor-induced FasL expression in human cholangiocarcinoma cells. *Dig Dis Sci.* 2010;55(10):2844-52.
125. Dougan M, Dranoff G. Immunotherapy of cancer. *Innate Immune Regulation and Cancer Immunotherapy.* 2012:391-414.

126. Rimoldi D, Samid D, Flessate DM, Friedman RM. Transcriptional inhibition of ha-ras in interferon-induced revertants of ras-transformed mouse cells. *Cancer Res.* 1988 Sep 15;48(18):5157-62.
127. Samid D, Shack S, Myers CE. Selective growth arrest and phenotypic reversion of prostate cancer cells in vitro by nontoxic pharmacological concentrations of phenylacetate. *J Clin Invest.* 1993;91(5):2288.
128. Samid D, Flessate DM, Friedman RM. Interferon-induced revertants of ras-transformed cells: Resistance to transformation by specific oncogenes and retransformation by 5-azacytidine. *Mol Cell Biol.* 1987;7(6):2196-200.
129. Friedman RM, Yeh A, Gutman P, Contente S, Kenyon K. Reversion by deletion of transforming oncogene following interferon-beta and retinoic acid treatment. *J Interferon Cytokine Res.* 1997 ; 17(10):647-51.
130. Gemignani F, Landi S, DeMarini DM, Kole R. Spontaneous and MNNG-induced reversion of an EGFP construct in HeLa cells: An assay for observing mutations in living cells by fluorescent microscopy. *Hum Mutat.* 2001; 18(6):526-34.
131. Boylan MO, Athanassiou M, Houle B, Wang Y, Zarbl H. Activation of tumor suppressor genes in nontumorigenic revertants of the HeLa cervical carcinoma cell line. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Res.* 1996;7(6):725.
132. Athanassiou M, Hu Y, Jing L, Houle B, Zarbl H, Mikheev AM. Stabilization and reactivation of the p53 tumor suppressor protein in nontumorigenic revertants of HeLa cervical cancer cells. *Cell Growth Differ.* 1999 ; 10(11):729-37.

133. Yu D, Fan W, Liu G, Nguy V, Chatterton JE, Long S, et al. PHTS, a novel putative tumor suppressor, is involved in the transformation reversion of HeLaHF cells independently of the p53 pathway. *Exp Cell Res*. 2006;312(6):865-76.
134. Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, Zarbl H. A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis*. 2004;25(1):47-59.
135. Le Boeuf F, Niknejad N, Wang J, Auer R, Weberpals JI, Bell JC, et al. Sensitivity of cervical carcinoma cells to vesicular stomatitis virus-induced oncolysis: Potential role of human papilloma virus infection. *Int J Cancer*. 2012 ; 131(3):e204-15.
136. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4 and CD8 T lymphocytes. *The FASEB J*. 1994;8(13):1055-60.
137. Steenbergen RD, Kramer D, Meijer CJ, Walboomers JM, Trott DA, Cuthbert AP, et al. Telomerase suppression by chromosome 6 in a human papillomavirus type 16-immortalized keratinocyte cell line and in a cervical cancer cell line. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(11):865-72.
138. Akiyama M, Yamada O, Kanda N, Akita S, Kawano T, Ohno T, et al. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. *Cancer Lett*. 2002;178(2):187-97.
139. Meerani S, Yao Y. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Eur.J.Sci.Res*. 2010;40(1):156-71.
140. Allalume X, El-Andaloussi N, Leuchs B, Bonifati S, Kulkarni A, Marttila T, et al. Retargeting of rat parvovirus H-1PV to cancer cells through genetic engineering of the viral capsid. *J Virol*. 2012 ; 86(7):3452-65.

141. Todo T. "Armed" oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell adh migr.* 2008 ; 2(3):208-13.
142. Friedman GK, Pressey JG, Reddy AT, Markert JM, Gillespie GY. Herpes simplex virus oncolytic therapy for pediatric malignancies. *Mol. Ther.* 2009;17(7):1125-35.
143. Yamamoto M, Curiel DT. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. *Molecular Ther.* 2009; 18(2):243-50.
144. Cripe TP, Wang P, Marcato P, Mahller YY, Lee PW. Targeting cancer-initiating cells with oncolytic viruses. *Mol. Ther.* 2009;17(10):1677-82.
145. Warenius HM. Oncology for lawyers (medico-legal series) (no. 10). 1998: 208.
146. Burstein HJ. Side effects of chemotherapy. case 1. radiation recall dermatitis from gemcitabine. *J Clin Oncol.* 2000 ; 18(3):693-4.
147. Partridge AH, Burstein HJ, Winer EP. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;Monographs(30):135-42.
148. Hesketh PJ. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med.* 2008;358(23):2482-94.
149. Paus R, Haslam IS, Sharov AA, Botchkarev VA. Pathobiology of chemotherapy-induced hair loss. *Lancet Oncol.* 2013; 14(2):e50-9.
150. Makower D, Rozenblit A, Kaufman H, Edelman M, Lane ME, Zwiebel J, et al. Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(2):693-702.

151. O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer cell*. 2004;6(6):611-23.
152. van Beusechem VW, van den Doel, Petra B, Grill J, Pinedo HM, Gerritsen WR. Conditionally replicative adenovirus expressing p53 exhibits enhanced oncolytic potency. *Cancer Res*. 2002;62(21):6165-71.
153. Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK. Mouse double minute antagonist nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene*. 2007; 26(24):3473-81.
154. McDermott U, Longley DB, Galligan L, Allen W, Wilson T, Johnston PG. Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2005; 65(19):8951-60.